



***Chlamydia trachomatis*: genótipos circulantes,
comparação de métodos para o seu diagnóstico e
necessidade do seu rastreio**

Ana Filipa Duque Serras

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Julho de 2010



***Chlamydia trachomatis*: genótipos circulantes,
comparação de métodos para o seu diagnóstico e
necessidade do seu rastreio**

Ana Filipa Duque Serras

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientação: Professora Doutora Filomena Pereira
Co-Orientação: Professora Doutora Rita Castro

**Unidade de Doenças Sexualmente Transmitidas
do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Julho de 2010

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Filomena Martins Pereira, orientadora da minha dissertação e à co-orientadora Professora Doutora Rita Castro, agradeço o apoio, a simpatia, a disponibilidade, a partilha de conhecimentos e as valiosas contribuições para o meu trabalho, tanto laboratorial como escrito.

À Dra. Emília Prieto pela simpatia, explicação, disponibilidade e apoio na execução do teste serológico, utilizado na minha dissertação.

À minha colega de trabalho de campo e laboratorial, Zúzeca Magalhães, pela boa disposição e energia que me transmitiu, pela sua ajuda e companheirismo após tantas horas extraordinárias de trabalho laboratorial, que foi um grande incentivo para a conclusão da minha dissertação. E acima de tudo pela sua dinâmica que me fez ver que na vida devo pensar sempre em seguir em frente e nunca pensar em recuar.

À minha colega de trabalho laboratorial, Miriam Silva, pela simpatia e energia que me transmitiu durante o trabalho laboratorial, à qual desejo o maior sucesso na vida profissional.

Aos meus pais e irmão, pela motivação transmitida e pelo encorajamento em fazer-me chegar sempre mais além e nunca desistir da luta.

Ao Hugo pela paciência, compressão e companheirismo, mostrando a dedicação necessária para conseguir finalizar a minha dissertação.

RESUMO

As infecções urogenitais originadas por *Chlamydia trachomatis* têm aumentado nos últimos anos em todo o mundo, afectando essencialmente jovens adultos com vida sexual activa. O seu rastreio recomenda-se nas mulheres entre os 19-25 anos de idade em alguns países Europeus, desde que seja de custo eficaz, para prevenção das suas complicações (doença inflamatória pélvica e infertilidade).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) são cada vez mais utilizados no seu diagnóstico pela sua elevada sensibilidade e especificidade.

Este estudo teve como objectivo conhecer a prevalência de infecção urogenital por *C. trachomatis* em populações de risco, através das técnicas de Multiplex PCR e de PCR em Tempo Real e identificar os genótipos de *C. trachomatis*. Pretendeu-se também conhecer a prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* e verificar a necessidade de execução do rastreio da infecção urogenital por *C. trachomatis*.

C. trachomatis foi identificada em amostras de indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria e da consulta da Unidade de DST do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, com uma prevalência de 25% (10/40) e 6,8% (5/74), respectivamente, tendo sido identificados quatro genótipos diferentes, D, Da, E e F. A técnica de PCR em Tempo Real apresentou melhores resultados na identificação de *C. trachomatis* do que a de Multiplex PCR.

A prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG com um título de 1:320 foi de 59,4% (57/96) e com um título de 1:1.000 foi de 39,6% (38/96). A prevalência de anticorpos da classe IgM, geralmente associada a infecção aguda, foi 35,9% (14/39) dos indivíduos.

No presente estudo verificou-se que, embora a pesquisa de anticorpos não pareça ser eficiente no diagnóstico de *C. trachomatis*, pode eventualmente ser útil como marcador epidemiológico de infecção.

O elevado número de anticorpos presente nos indivíduos do nosso estudo parece indicar a necessidade do rastreio da infecção urogenital por *C. trachomatis* neste tipo de populações.

ABSTRACT

Urogenital infections caused by *Chlamydia trachomatis* have increased in the last years all over the world, affecting mainly sexually active young adults. Screening for this microorganism is recommended in women between 19 and 25 years of age in some European countries, as long as it is shown to be cost effective in view of preventing disease's complications (pelvic inflammatory disease and infertility).

For the diagnosis of this microorganism, nucleic acid amplification tests (NAATs) are increasingly being used due to its high sensitivity and specificity.

The aims of this study were to detect the prevalence of urogenital infection by *C. trachomatis* in high risk populations, through the use of Multiplex PCR and Real Time-PCR techniques, to identify the genotypes of *C. trachomatis* infections and to verify the need for the implementation of *C. trachomatis* screening.

C. trachomatis infection was identified in samples from individuals attending a STD clinic at Hospital de Santa Maria and at Unidade de DST of Instituto de Higiene e Medicina Tropical, with a prevalence of 25% (10/40) and 6.8% (5/74), respectively, and four different genotypes were identified, D, Da, E and F. The Real Time-PCR technique provided better results in the identification of *C. trachomatis* than the Multiplex PCR technique.

The prevalence of *C. trachomatis* IgG antibodies with a title of 1:320 was 59,4% (57/96) and with a title of 1:1.000 was 39,6% (38/96). The prevalence of IgM antibodies, generally associated with an acute infection, was 35,9% (14/39).

This study showed that antibodies testing is not efficient in the diagnosis of *C. trachomatis* infection. However it can probably be used as an epidemiological marker of this infection.

The high level of antibodies observed in the individuals of this study may indicate the need for the screening *C. trachomatis* urogenital infections, in these population groups.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE GERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Chlamydiae</i>	1
1.1.1 Propriedades gerais.....	1
1.1.2 Taxonomia.....	3
1.1.3 Factos históricos.....	4
1.1.4 Ciclo de desenvolvimento celular.....	5
1.1.5 Características genómicas.....	6
1.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	7
1.2.1 Serótipos.....	7
1.2.2 Infecções urogenitais.....	8
1.2.2.1 Epidemiologia.....	10
1.2.2.2 Manifestações clínicas.....	13
1.2.2.2.1 Na mulher.....	13
1.2.2.2.1.1 Infecção neonatal.....	15
1.2.2.2.2 No homem.....	15
1.2.2.2.3 Em ambos os sexos.....	16
1.2.2.3 Tratamento.....	17
1.2.3 Linfogranuloma venéreo.....	17
1.2.3.1 Epidemiologia.....	18
1.2.3.2 Manifestações clínicas.....	18
1.2.3.3 Tratamento.....	20

1.3 Diagnóstico laboratorial de <i>C. trachomatis</i>	20
1.3.1 Testes culturais.....	21
1.3.2 Testes não culturais.....	23
1.3.2.1 Teste ensaio imunoenzimático (EIA)	23
1.3.2.2 Teste de imunofluorescência directa (DFA)	24
1.3.2.3 Testes rápidos (<i>point-of-care test</i>)	25
1.3.3 Testes de detecção de ácidos nucleicos.....	26
1.3.3.1 Testes de hibridação dos ácidos nucleicos.....	28
1.3.3.2 Testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs).....	28
1.3.3.2.1 PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>).....	30
1.3.3.2.2 SDA (<i>Strand displacement amplification</i>).....	32
1.3.3.2.3 TMA (<i>Transcription-mediated amplification</i>).....	32
1.3.4 Testes serológicos.....	33
1.3.5 A escolha do teste.....	35
1.4 Genotipagem.....	37
1.5 Rastreio.....	38
1.6 Objectivos.....	41
2. MATERIAS E MÉTODOS.....	42
2.1 População do estudo.....	42
2.2 Preparação das amostras.....	43
2.3 Métodos.....	44
2.3.1 Identificação de <i>C. trachomatis</i> por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos.....	44
2.3.1.1 Extracção de DNA.....	44
2.3.1.2 Técnica de Multiplex PCR.....	46
2.3.1.3 Técnica de PCR em Tempo Real	48
2.3.2 Genotipagem.....	50
2.3.3 Pesquisa e quantificação de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i>	52
3. RESULTADOS.....	56
3.1 Caracterização da população.....	56

3.2 Identificação de <i>C. trachomatis</i> por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos..	58
3.2.1 Técnica de Multiplex PCR.....	59
3.2.2 Técnica de PCR em Tempo Real.....	61
3.2.3 Comparação dos resultados das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos utilizadas.....	61
3.3 Genotipagem.....	62
3.4 Prevalência de infecção por <i>C. trachomatis</i>	63
3.5 Genótipos de <i>C. trachomatis</i>	64
3.6 Pesquisa e quantificação de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i>	65
3.6.1 Prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgG.....	66
3.6.2 Prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgM.....	67
3.6.3 Presença de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> , género e idade.....	67
3.6.4 Presença de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> e presença de DNA de <i>C. trachomatis</i>	68
 4. DISCUSSÃO.....	70
4.1 População.....	71
4.2 Identificação de <i>C. trachomatis</i> por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos..	72
4.3 Prevalência de infecção por <i>C. trachomatis</i>	74
4.4 Genótipos de <i>C. trachomatis</i>	76
4.5 Prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i>	77
4.6 Relação entre a prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> e a prevalência de <i>C. trachomatis</i>	79
4.7 Necessidade de execução do rastreio de infecção por <i>C. trachomatis</i>	80
 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	82
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Fotografia de microscopia electrónica (x 160.000) de <i>Chlamydia trachomatis</i> no citoplasma de uma célula, onde se vêem os diferentes estágios de desenvolvimento: corpúsculos elementares (EB), corpúsculos reticulados (RB) e os corpúsculos intermédios (IB). b) Corpúsculos elementares de <i>Chlamydia</i> . As células infectadas apresentam aspecto verde fluorescente devido à marcação de <i>Chlamydia</i> com anticorpos monoclonais. Os pequenos pontos verdes fluorescentes na imagem são os corpúsculos elementares.....	2
Figura 2. Representação esquemática do ciclo infeccioso de <i>Chlamydiae</i>	5
Figura 3. Número de casos estimados de infecção por <i>C. trachomatis</i> em adultos, 1999.....	10
Figura 4. Cervicite causada por <i>C. trachomatis</i>	13
Figura 5. Uretrite num homem causada por <i>C. trachomatis</i>	16
Figura 6. Úlcera genital e linfadenopatia inguinal devido a infecção por LGV.....	20
Figura 7. Curva correspondente ao sinal de fluorescência do canal JOE resultante da amplificação do fragmento do gene <i>omp1</i>	49
Figura 8. Curva correspondente ao sinal de fluorescência do canal ROX resultante da amplificação do fragmento do gene do plasmídeo críptico.....	50
Figura 9. Esquema representativo da técnica de imunofluorescência indirecta.....	53
Figura 10. Exemplo de um resultado positivo na pesquisa de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i>	54
Figura 11. Idade dos indivíduos estudados.....	57
Figura 12. Amostras clínicas utilizadas nas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos.....	58
Figura 13. Produtos amplificados pela técnica de Multiplex PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%	59
Figura 14. Produtos amplificados pela técnica de Multiplex PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%	60

Figura 15. Resultado da amplificação da amostra com banda da amplificação do plasmídio críptico sem e com diluições sucessivas, pela técnica de Multiplex PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%	60
Figura 16. Resultado da amplificação pela técnica de Nested-PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%	62
Figura 17. Genótipos identificados nos indivíduos do estudo.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Os serótipos de <i>C. trachomatis</i> e as patologias associadas.....	7
Tabela 2. Genes alvo, descrição dos <i>primers</i> e tamanho dos produtos de PCR amplificados, utilizados na técnica de Multiplex PCR para detecção de DNA de <i>C. trachomatis</i>	46
Tabela 3. Descrição dos <i>primers</i> , sondas e suas sequências, utilizadas na técnica de PCR em Tempo Real para detecção de DNA de <i>C. trachomatis</i>	48
Tabela 4. Descrição dos <i>primers</i> e do tamanho dos fragmentos amplificados utilizados na técnica de Nested-PCR.....	50
Tabela 5. Caracterização da população e das amostras analisadas pelos vários grupos estudados.....	56
Tabela 6. Distribuição das amostras analisadas de acordo com os grupos estudados...	58
Tabela 7. Resultados da técnica de Multiplex PCR.....	59
Tabela 8. Resultados da técnica PCR em Tempo Real.....	61
Tabela 9. Comparação de resultados das técnicas de Multiplex PCR e de PCR em Tempo Real.....	61
Tabela 10. Resultados das técnicas de Multiplex PCR, PCR em tempo real e Nested-PCR.....	63
Tabela 11. Prevalência da infecção por <i>C. trachomatis</i> (HSM e IHMT).....	64
Tabela 12. Genótipos de <i>C. trachomatis</i> identificados por género dos Indivíduos do estudo.....	65
Tabela 13. Prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgG.....	66
Tabela 14. Prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgG nos vários grupos analisados.....	66
Tabela 15. Prevalência de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgM.....	67
Tabela 16. Título de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgG e IgM e o género dos indivíduos.....	68
Tabela 17. Presença de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i> da classe IgG e IgM e identificação de DNA de <i>C. trachomatis</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
bp: pares de bases
C. pneumoniae: *Chlamydia pneumoniae*
C. psittaci: *Chlamydia psittaci*
C. trachomatis: *Chlamydia trachomatis*
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
CE: corpúsculo elementar
CR: corpúsculo reticulado
DFA: teste de imunofluorescência directa
DIP: doença inflamatória pélvica
DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desorribonucleico)
dNTP's: desorribonucleotídeos trifosfatos
EIA: ensaio imunoenzimático
FDA: *Food and Drug Administration*
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HSH: homens que têm sexo com homens
HSM: Hospital de Santa Maria
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IHMT: Instituto de Higiene e Medicina Tropical
ILGA: *International Lesbian and Gay Association*
IST: Infecções sexualmente transmitidas
kDa: kilodaltons
LCR: *ligase chain reaction*
LGV: linfogranuloma venéreo
LPS: lipopolissacárido
MgCl₂: cloreto de magnésio
MIF: micro-imunofluorescência
ml: mililitros

mM: milimolar

MOMP: *Major Outer Membrane Protein*

N. gonorrhoeae: *Neisseria gonorrhoeae*

NAAT: testes de amplificação de ácidos nucleicos

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: *polymerase chain reaction*

RFLP: *Restriction fragment lenght polymorphism*

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal

SDA: *strand displacement amplification*

TMA: *transcription mediated amplification*

UV: raios ultravioleta

V: volts

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

µg: microgramas

µl: microlitro

µM: micromolar

1. INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmitidas (IST) encontram-se entre as causas mais frequentes de doença no mundo e originam graves problemas médicos, psicológicos e económicos para milhões de adultos e crianças (91, 134).

A magnitude exacta do número de casos de IST continua incerta, embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) estime que existem cerca de 340 milhões de novos casos por ano (134).

O tratamento de IST na fase inicial é de extrema importância, tanto para reduzir a sua transmissão, bem como para evitar complicações e sequelas graves, principalmente na mulher, como infertilidade, gravidez ectópica, cancro cervical e anogenital (2, 20, 91).

Apesar da evolução na prevenção, diagnóstico e tratamento de algumas IST em anos recentes, o número de casos destas infecções continua a aumentar, o que se deve não só a um aumento real como a uma combinação de factores onde se inclui o aumento do número de rastreios e o aumento da sensibilidade dos testes de diagnóstico (20, 24).

1.1 *Chlamydiae*

Chlamydiae são bactérias ubiquitárias com capacidade metabólica limitada e crescimento restrito ao meio intracelular de células vivas (55, 92, 94).

Caracterizam-se por um ciclo de desenvolvimento bifásico, único nos procariotas, com morfologia e adaptação distintas a ciclos alternados de parasitismo intracelular e permanência extracelular (25, 81, 94).

1.1.1 Propriedades gerais

Chlamydiae são bactérias de coloração de Gram negativa, imóveis, com cerca de 0,2 a 1,5µm de diâmetro, que carecem de mecanismos para a produção de energia metabólica, pois são incapazes de sintetizar ATP. Estas características restringem a uma existência intracelular, em que a célula do hospedeiro fornece intermediários ricos em

energia e possibilita a sua multiplicação, pelo que se designam parasitas intracelulares obrigatórios das células eucarióticas (10, 14, 25, 54, 81, 107, 132, 140).

Os microrganismos da ordem *Chlamydiae* exibem características morfológicas semelhantes, são bactérias dimórficas que possuem DNA e RNA, ribossomas, compartilham um antígeno comum e multiplicam-se no citoplasma das células hospedeiras no interior de um fagossoma, que ao microscópio se apresenta como uma inclusão intracelular característica (14, 81, 107, 140).

As duas formas morfológicas distintas são o corpúsculo elementar e o corpúsculo reticulado (figura 1). O corpúsculo elementar (CE) é a forma infectante, adaptado à sobrevivência extracelular mas metabolicamente inactivo, que tem cerca de 0,2 a 0,4µm de diâmetro, com material nuclear electro-denso, RNA ribossómico e uma parede celular rígida. O corpúsculo reticulado (CR) tem cerca de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, é a forma não infecciosa adaptada à sobrevivência e replicação intracelular, é metabolicamente activo, possui o material nuclear menos denso e mais ribossomas do que o CE (14, 25, 54, 94, 100, 140).

Numa coloração de Giemsa, os corpúsculos reticulares são basófilos (núcleo e citoplasma cor púrpura a azul escuro) e os corpúsculos elementares são eosinófilos (núcleo azul e citoplasma rosa pálido) (25).

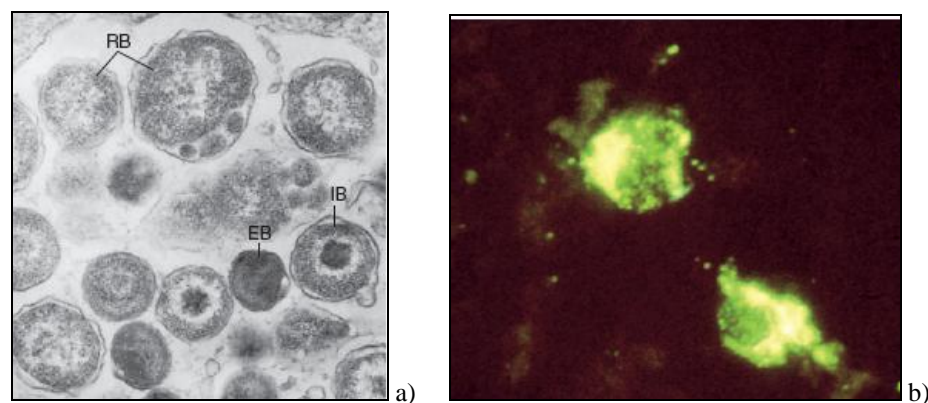


Figura 1. a) Fotografia de microscopia electrónica (x160.000) de *Chlamydia trachomatis* no citoplasma de uma célula, onde se vêem os diferentes estágios de desenvolvimento: corpúsculos elementares (EB), corpúsculos reticulados (RB) e os corpúsculos intermédios (IB). b) Corpúsculos elementares de *Chlamydia*. As células infectadas apresentam aspecto verde fluorescente devido à marcação de *Chlamydia* com anticorpos monoclonais.

Os pequenos pontos verdes fluorescentes na imagem são os corpúsculos elementares.

Adaptado de Prescott L. e tal. In *Microbiology* (100).

Como características estruturais da membrana externa, existe o lipopolissacárido (LPS), a proteína principal da membrana externa (MOMP, *Major Outer Membrane Protein*) e as proteínas OmcA e OmcB (anteriormente designados de Omp2 e Omp3) (25).

O LPS tem uma pequena actividade endotóxica, pela sua composição altamente hidrofóbica (lipído A com ácidos gordos de cadeias longas) e contém um epítipo específico de género composto por ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulopirasonico (KDO) trissacarídeo, cuja superfície está exposta, sendo bastante imunogénico (25). É, por isso, utilizado nos testes serológicos específicos de género (25, 140).

A MOMP é uma proteína transmembranar (40kDa) codificada pelo gene *omp1* (*ompA*) que possui quatro regiões expostas de sequências variáveis de aminoácidos, VS1, VS2, VS3 e VS4. Estas quatro regiões estão na base da variedade antigénica entre os serótipos e permitem agrupar os serótipos em serogrupos (5, 25, 65, 71, 86, 97).

A MOMP é pois, um componente de grande importância no diagnóstico, pois define uma complexa relação antigénica, a especificidade de espécies, dos serogrupos (B, F/G, C) e dos serótipos (5, 65, 71).

As proteínas OmcA e OmcB são ricas em cistina que exibem ligações cruzadas de dissulfeto intra e inter-molecular com a membrana externa, sendo proteínas importantes para a estabilidade e impermeabilidade dos corpúsculos elementares (25).

1.1.2 Taxonomia

Presentemente, na ordem *Chlamydiales*, existem quatro famílias, sendo a mais relevante a família *Chlamydiaceae*. Esta família é actualmente composta por dois géneros, *Chlamydia* e *Chlamydophila*, com três e seis espécies, respectivamente (25, 31, 32).

Chlamydia trachomatis é a única espécie do género *Chlamydia* que apenas causa doença no homem e pode, dependendo do serótipo infectante, ser responsável por tracoma, conjuntivite de inclusão, infecções urogenitais ou respiratórias (14, 25, 55, 107, 140).

No género *Chlamydophila* existem duas espécies patogénicas para o homem: *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia pneumoniae* (25, 31, 32).

C. pneumoniae está associada a infecções no aparelho respiratório superior (faringite, bronquite, sinusite, otite) e é responsável por cerca de 10-15% de todas as pneumonias adquiridas na comunidade (10, 14, 25, 55, 140).

C. psittaci está mundialmente distribuída entre aves, bovinos e ovinos, mas por exposição a material infeccioso (exemplo fezes) pode desencadear no homem, psitacose também chamada de ornitose, uma pneumonia grave com sintomatologia atípica e com elevada taxa de mortalidade (10, 14, 25, 55).

Os membros da ordem *Chlamydiales* são frequentemente designados por *Chlamydiae*, partilham mais de 80% na sequência do gene que codifica o seu 16S rRNA e/ou mais de 80% no gene que codifica para o seu 23S rRNA (31, 107).

1.1.3 Factos históricos

As infecções por *C. trachomatis* são mencionadas desde a Antiguidade, tendo sido encontradas referências a estas, na China Antiga e no Egipto, no papiro de Ebers escrito há cerca de 3.800 anos (14, 107).

A primeira descrição de infecção por *C. trachomatis* no aparelho urogenital ocorreu em 1910, quando Heyman observou num exsudado uretral de um doente, inclusões como as anteriormente visualizadas em 1907 por Halberstaedter e von Prowazek, numa amostra de um exsudado ocular proveniente um indivíduo com tracoma (52). A confirmação foi obtida em 1910, por Fritsch e seus colaboradores, ao infectarem a conjuntiva de macacos bebés (conjuntivite neonatal) com secreções cervicais e uretrais infectadas. O primeiro isolamento de *C. trachomatis* do aparelho urogenital foi descrito por Jones e colaboradores em 1959, a partir de células do colo do útero de uma mãe com um recém-nascido com conjuntivite neonatal, em cultura de ovos embrionados. Esta técnica já tinha sido utilizada por Tang em 1957 para a identificação de *C. trachomatis* como agente etiológico de tracoma (52, 107, 130).

Em 1975, durante um estudo sobre conjuntivite em recém-nascidos, observou-se que estes, quando expostos a *C. trachomatis* durante o parto poderiam desenvolver uma pneumonia, pelo que *C. trachomatis* passou também a ser conhecida como capaz de originar pneumonia nos recém-nascidos (107).

O linfogranuloma venéreo (LGV), originado pelos serótipos mais invasivos de *C. trachomatis*, foi descrito por Wallace em 1833, mas só foi caracterizado como entidade clínica e patológica em 1913 por Durand, Nicolas e Favre (22, 33).

1.1.4 Ciclo de desenvolvimento celular

O ciclo de desenvolvimento celular bifásico de *Chlamydiae* dura cerca de 36 a 72 horas. Nele existem duas formas do microrganismo, como descrito anteriormente, o corpúsculo elementar (CE), forma infecciosa e estável no meio extracelular e o corpúsculo reticulado (CR), forma não infecciosa e intracelular (figura 2) (25, 94).

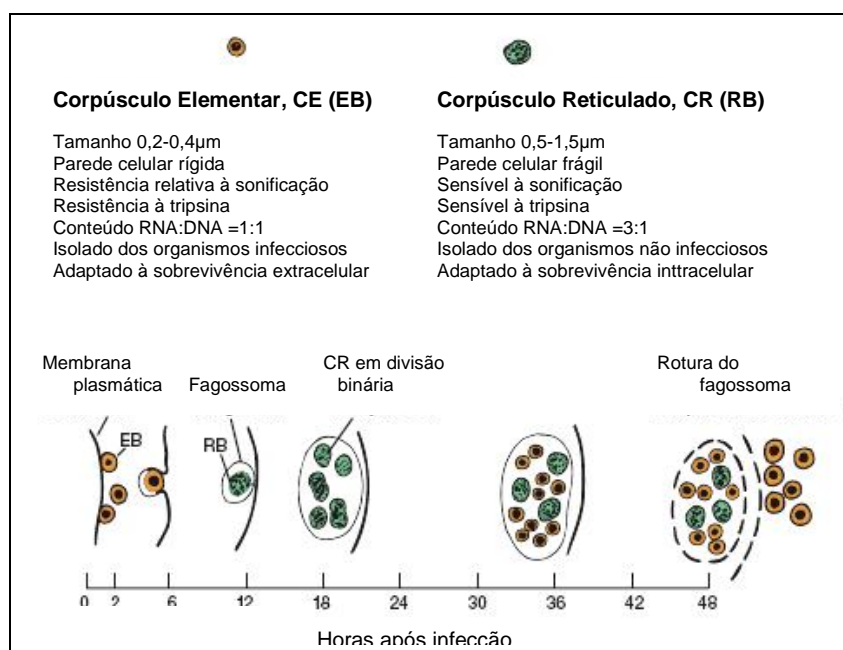


Figura 2. Representação esquemática do ciclo infeccioso de *Chlamydiae*.

Adaptado de Prescott L. *et al.* In *Microbiology* (100).

As células eucarióticas são infectadas quando um corpúsculo elementar (CE) adere à membrana citoplasmática de uma microvilosidade de uma célula epitelial colunar ou escamosa susceptível. Esta adesão é provocada por adesinas e receptores celulares, num processo ainda não totalmente conhecido (25, 140).

Os CE penetram na célula por endocitose e permanecem no fagossoma intracelular durante todo o tempo de estadia intracelular (14, 24, 81).

Uma vez dentro do fagossoma, cerca de 6 a 8 horas após a penetração, os CE transformam-se em corpúsculos reticulados (CR) e aumentam de tamanho, com subsequente início da síntese de DNA, RNA e proteínas e dividem-se por divisão binária, utilizando os recursos energéticos da célula hospedeira (94, 140).

Após cerca de 18 a 24 horas, presumivelmente quando os nutrientes da célula hospedeira esgotam, os CR são gradualmente transformados em CE, que são libertados da célula hospedeira entre as 36 e as 72 horas seguintes, por rotura do fagossoma, infectando novas células (25, 81, 100).

1.1.5 Características genómicas

Após 1998, data da publicação do genoma completo da estirpe óculo-genital D/UW-3/Cx e do genoma parcial do serótipo L2 de *C. trachomatis*, vários estudos até aos dias de hoje têm comparado o genoma das bactérias pertencentes à ordem *Chlamydiales* com o de outras bactérias (25).

As bactérias da ordem *Chlamydiales* têm o segundo genoma mais pequeno de todas as bactérias, um pouco maior do que o genoma de *Mycoplasma*, o mais pequeno genoma bacteriano (131).

O cromossoma de *C. trachomatis* tem cerca de 1.042.510 bp, mas esta possui ainda cerca de 7.493 bp num plasmídeo críptico (pCT) (25, 131). Este último, tem uma importância extrema a nível prático, porque é o alvo favorito em técnicas de detecção de ácidos nucleicos, as quais são hoje as mais utilizadas para o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* (4, 10, 72, 131).

O genoma de *C. trachomatis* codifica aproximadamente 875 proteínas, mas nem todas são necessariamente expressas. Durante a sequenciação do genoma verificou-se que cerca de 70 proteínas são exclusivamente de *C. trachomatis*, mas não de *C. pneumoniae*. Pelo contrário, cerca de 200 proteínas são exclusivas desta última bactéria, mas não de *C. trachomatis* (131).

1.2 *Chlamydia trachomatis*

As infecções por *C. trachomatis* podem ser divididas em três categorias clínicas: 1. Tracoma ocular clássico; 2. Infecções urogenitais em adultos, infecção neonatal e conjuntivite de inclusão 3. Linfogranuloma venéreo (LGV).

As manifestações clínicas e os órgãos que podem ser infectados por *C. trachomatis* são determinados tanto pelo mecanismo de transmissão, como pelas propriedades do serótipo infectante.

1.2.1 Serótipos

Foram identificados 20 serótipos de *C. trachomatis*, tendo sido caracterizadas várias serovariantes associados a uma patologia específica (tabela 1) (25, 79).

Os serótipos A, B, Ba e C infectam principalmente a conjuntiva e estão associados ao tracoma, uma doença ocular caracterizada por uma queratoconjuntivite crónica que se inicia com alterações inflamatórias agudas na conjuntiva e na córnea, progredindo na formação de cicatrizes, podendo originar cegueira (14, 53, 107, 135).

Os serótipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K são predominantemente isolados do aparelho urogenital e são responsáveis por infecções sexualmente transmitidas, conjuntivite de inclusão e pneumonia e conjuntivite neonatal (14, 25, 107, 130).

Os serótipos L1, L2, L2a, L2b e L3 estão associados ao linfogranuloma venéreo (25, 79, 116, 121, 124).

As infecções urogenitais em adultos e o linfogranuloma venéreo (LGV) são as infecções abordadas nesta tese, já que são sexualmente transmitidas.

Tabela 1. Os serótipos de *C. trachomatis* e as patologias associadas.

Adaptado de <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/chlamyd.htm>

Serotipo	Patologia Associada	Distribuição
A, B, Ba, C	Tracoma	Ásia e África
D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K	Infecções urogenitais, conjuntivite de inclusão e infecções perinatais	Global
L1, L2, L2a, L2b e L3	Linfogranuloma venéreo	Global

Na generalidade, o serótipo E é o mais prevalente, seguido do serótipo F ou G e do serótipo D. Alguns estudos referem que estes serótipos não estão associados a género ou área geográfica e também não estão associados à presença ou à ausência de sintoma(s) clínico(s), embora outros refiram que o serótipo E pode estar associado a indivíduos assintomáticos e os serótipos F e D associados a corrimento vaginal mucopurulento (11, 30, 64, 79, 115, 119).

Alguns autores referem ainda que na população homossexual masculina, os serótipos mais prevalente são D/Da (cerca de 54%), seguido dos serótipos G e J (30, 40, 122).

Um estudo realizado por Borrego *et al.* (11) em Portugal durante 1991 a 1996 em consultas de planeamento familiar e de ginecologia na área de Lisboa, o serótipo E foi identificado como o mais prevalente, seguido dos serótipos H, F, G, D. Neste estudo observou-se que o serótipo H foi o segundo maior prevalente no sexo feminino, apesar de na maioria dos estudos publicados por outros autores (30, 79, 115), ser relatado o serótipo F.

Outro estudo realizado por Gomes *et al.* (42) em Portugal durante 2000 e 2003 em consultas de planeamento familiar e de medicina geral e familiar na área de Lisboa, identificou o serótipo E como o mais prevalente, seguido do serótipo F. O serótipo G foi o terceiro mais prevalente, seguido do serótipo D ou Da que é normalmente o terceiro serótipo mais prevalente.

Morre *et al.* (79) por seu lado, identificaram o serótipo Ga como estando associado a infecção sintomática (disúria) no homem, detectaram o serótipo Ia em mulheres e homens assintomáticos e associaram o serótipo K a corrimento vaginal mucopulento.

Em relação à infecção mista com mais de um serótipo de *C. trachomatis*, alguns estudos relatam que a sua prevalência pode oscilar entre 1 a 50% (79).

1.2.2 Infecções urogenitais

As infecções urogenitais causadas por *C. trachomatis* estão associadas aos serótipos D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J e K (14, 25, 107, 132). Estes serótipos estão

também associados a infecção ocular, designada por conjuntivite de inclusão e a infecção neonatal, pelo que se intitulam serótipos óculo-genitais (14, 25, 94, 107, 132).

A morbilidade associada a infecções por *C. trachomatis* é enorme, bem como os custos associados às suas sequelas. O maior impacto da infecção ocorre no sistema reprodutor das mulheres (7, 25, 92, 112).

A infecção pode ser transmitida através de secreções e das membranas mucosas infectadas durante o sexo vaginal, anal ou oral e ao recém-nascido durante o parto vaginal, se a mãe estiver infectada (7, 23, 25, 112).

As secreções genitais de indivíduos infectados podem ser auto-inoculadas na conjuntiva, com consequente conjuntivite de inclusão (14, 107, 132).

As infecções urogenitais por *C. trachomatis* podem causar uretrite, proctite, faringite e conjuntivite em ambos os sexos. Nos homens, a infecção é usualmente sintomática com disúria e corrimento uretral e quando não tratada pode originar epididimite. Na maioria das mulheres, a infecção é assintomática, mas pode originar uma cervicite mucopurulenta e quando não tratada pode desenvolver-se doença inflamatória pélvica (DIP) (7, 10, 81).

A infecção por *C. trachomatis* em recém-nascidos pode originar uma conjuntivite (*ophthalmia neonatorum*) ou uma pneumonia (7, 10, 76).

Cerca de 70 a 80% das mulheres infectadas e cerca de 50% dos homens infectados são assintomáticos, os quais podem transmitir a infecção aos seus parceiros sexuais (3, 15, 127, 130).

A recorrência das infecções é comum (23, 25, 57), especialmente nos indivíduos que se infectam antes dos 20 anos de idade (10, 57). Vários estudos apontam para que as infecções recorrentes sejam capazes de provocar um aumento do risco de desenvolver sequelas, como a doença inflamatória pélvica e de contrair a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (84, 103, 112, 138).

Nos adultos, o espectro clínico das infecções sexualmente transmitidas por *C. trachomatis* é paralelo ao espectro das infecções gonocócicas. É comum a ocorrência de infecção simultânea por *C. trachomatis* e por *Neisseria gonorrhoeae*, estimando que cerca de 40% de homens e cerca de 30 a 50% de mulheres com infecção por *N. gonorrhoeae* possuem uma co-infecção por *C. trachomatis* (10, 15, 54, 107).

1.2.2.1 Epidemiologia

Segundo a OMS e o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) (2, 18, 21, 23, 24), a infecção urogenital por *C. trachomatis* tornou-se, nos últimos anos, a infecção sexualmente transmitida mais frequente em todo o mundo (24, 83, 92, 134). A incidência mundial de IST curáveis (sífilis, gonorreia, infecções por *C. trachomatis* e tricomonose) foi de 340 milhões de novos casos em 1999 e destes, cerca de 92 milhões foram referentes a infecção por *C. trachomatis* (figura 3) (81, 83, 92, 134).

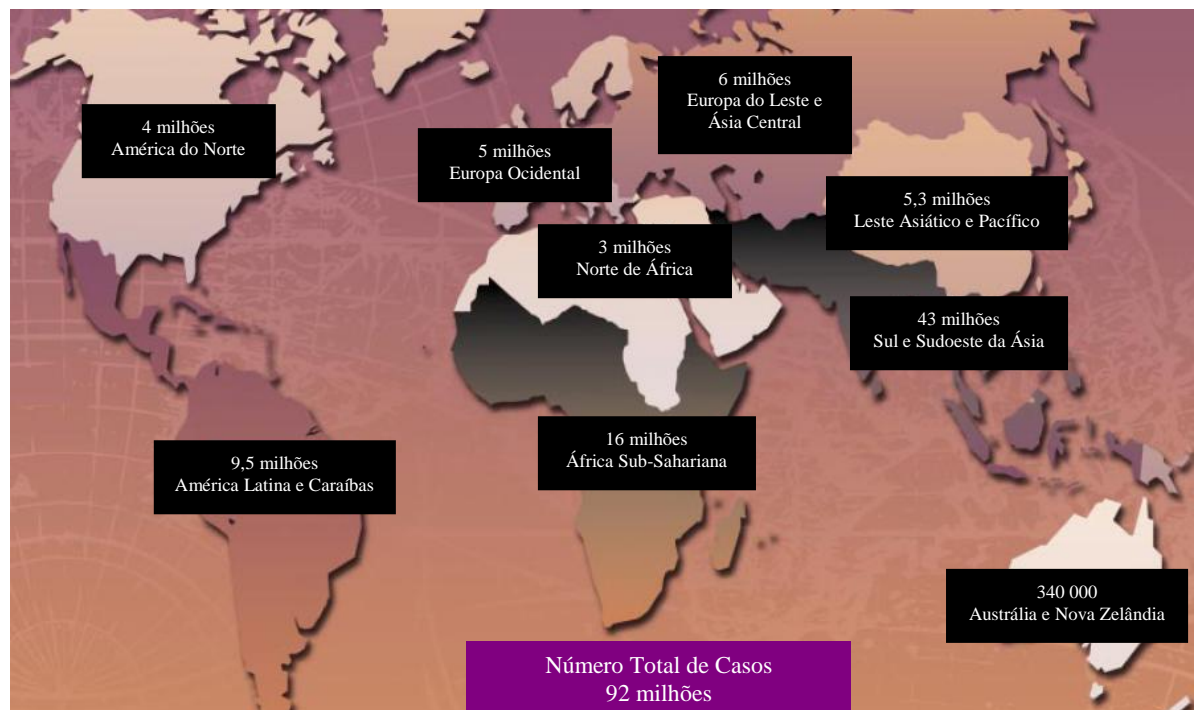


Figura 3. Número de casos estimados de infecção por *C. trachomatis* em adultos, 1999.

Adaptado de: OMS. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. 2001 (134)

Enquanto o número de casos de infecção por *N. gonorrhoeae* diminuiu nos últimos anos em muitos países desenvolvidos, o número de casos de infecções urogenitais por *C. trachomatis* tem aumentado (7, 134).

A correlação demográfica mais comum da infecção por *C. trachomatis* é a idade ser inferior a 20 anos. Outros factores importantes são a raça negra, o baixo nível sócio-económico, o número elevado de parceiros sexuais, as relações sexuais acidentais ou ocasionais, o uso irregular ou mesmo a má utilização de contracepção de barreira

durante uma relação sexual e a infecção genital com *N. gonorrhoeae* ou outros microrganismos transmitidos por via sexual (10, 61, 83).

Como anteriormente referido a idade é um factor muito importante na prevalência de infecção urogenital por *C. trachomatis*. Segundo o CDC, nos Estados Unidos e Canadá, as maiores incidências de infecções por *C. trachomatis* são observadas em adolescentes e jovens adultos (7, 23, 83, 84), o mesmo se tem verificado nos países Europeus (7, 83, 137).

Desde que em Dezembro de 2000, os Estados Unidos implementaram a declaração obrigatória dos casos de infecção por *C. trachomatis*, foram declarados cerca de 1,5 milhões de novos casos de *C. trachomatis* por ano em adolescentes entre os 15 e os 24 anos (20, 23, 84)

Relativamente ao sexo, são as adolescentes do sexo feminino as que têm um maior risco de contraírem a infecção, o que se revela nas taxas de incidência que são maiores do que as dos adolescentes do sexo masculino. As alterações no cérvix que ocorrem durante a puberdade tornam o sexo feminino mais vulnerável à infecção (23, 24, 61, 71, 83).

Estima-se que existam cerca de 1,64 milhões de novos casos em homens e 2,34 milhões de novos casos em mulheres na América do Norte, bem como 2,30 milhões em homens e 3,20 milhões em mulheres na Europa Ocidental e em 120.000 homens e em 170.000 mulheres na Austrália (7, 24, 83).

Na Europa, a prevalência de infecção por *C. trachomatis* nas mulheres varia entre 4,1% e 25% e nos homens de 1,2% a 12%, dependendo dos testes utilizados, população e do país em estudo (7, 61, 137).

Num estudo (13) realizado no ano de 2002, em Lisboa, obteve-se uma prevalência de 5,3% em mulheres com idade inferior a 19 anos, 4,8% em mulheres entre 20-25 anos e 3,9% nas que têm entre 26-30 anos de idade. Nesse estudo, verificou-se que a prevalência era maior em mulheres de etnia africana do que de etnia europeia (9,8% vs 3,8%).

Muitos países não têm dados epidemiológicos, uma vez que a infecção não é sempre declarada, outros não estão organizados e em alguns apenas estão disponíveis dados que dizem respeito aos grupos de risco ou a indivíduos atendidos em consultas. Todos os dados estatísticos devem ser interpretados com alguma atenção, pois são

influenciados pelos testes de diagnóstico utilizados, prática clínica, acessos aos cuidados de saúde e tipo de população estudada (81, 83).

Outra dificuldade reside no elevado número de casos assintomáticos, sendo a maioria dos casos detectados nos exames médicos de rotina ou em rastreios de populações com comportamentos de risco (7, 10, 18, 23, 71, 83, 137).

Segundo o CDC, as taxas de prevalência da infecção por *C. trachomatis* são de 5% a 20% entre mulheres atendidas em consultas de planeamento familiar, de 20% a 40% em adolescentes do sexo feminino sexualmente activas que frequentam clínicas de IST e cerca de 25% em todas as mulheres de consultas de ginecologia. Aproximadamente 8% das mulheres jovens atendidas em maternidades, sem sintomas de infecção urogenital, são portadoras de *C. trachomatis*. Cerca de 65% de recém-nascidos são infectados durante o parto vaginal de mães infectadas com *C. trachomatis* (10, 18, 45).

Nos homens, a prevalência de infecção deste microrganismo, varia entre 4 a 10% em casos assintomáticos e 15 a 20% em casos sintomáticos (45, 56).

A raça ou grupos étnicos e o estado sócio-económico são considerados em conjunto como factores de risco. Vários estudos revelaram que um nível sócio-económico mais baixo aumenta a prevalência de IST (83, 84), devido à dificuldade no acesso a cuidados médicos e respectivos tratamentos. Verificou-se ainda que as mulheres pertencentes a um estado sócio-económico mais elevado, estão sujeitas a mais exames e consultas de rotina e por consequência, os casos assintomáticos são diagnosticados aumentando a prevalência da infecção por *C. trachomatis* neste grupo (2, 23, 24, 45, 61, 83, 84, 134).

O elevado número de parceiros sexuais e a prática de sexo desprotegido aumenta a probabilidade de transmissão de IST, incluindo *C. trachomatis*, essencialmente se forem parceiros ocasionais, muitas vezes assintomáticos, com a consequente impossibilidade de serem rastreados (7, 10, 45, 61, 84).

O uso de métodos contraceptivos orais (pílula) também aumenta o risco de infecção genital por *C. trachomatis* por indução de ectopia, originando mais células epiteliais endocervicais, as quais são mais susceptíveis à infecção (83).

Existe uma forte correlação entre a disseminação das IST convencionais e a transmissão de HIV. No caso da infecção urogenital por *C. trachomatis*, tanto as lesões

não ulcerativas, no caso de uma uretrite, como as lesões ulcerativas, no caso do LGV, aumentam o risco de transmissão de HIV (2, 3, 10, 89, 91, 103, 134, 138).

A infecção prévia por *C. trachomatis* em mulheres portadoras do vírus do papiloma humano (HPV) parece, segundo alguns autores, favorecer a persistência viral, considerada factor de risco para o desenvolvimento de cancro do colo do útero, embora não haja provas conclusivas sobre esta matéria (81, 89, 105, 114).

1.2.2.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas das infecções urogenitais originadas por *C. trachomatis* podem aparecer entre 1 a 3 semanas após a exposição (7, 23, 71, 130).

1.2.2.2.1 Na mulher

Na mulher, a localização primária de infecção urogenital por *C. trachomatis* é o colo do útero, originando uma cervicite, mas também pode ocorrer infecção, simultânea ou não, da uretra e do recto (10, 92, 112).

Os sintomas da cervicite por *C. trachomatis*, acompanhada ou não de uretrite são corrimento vaginal mucopurulento, ectopia ectocervical que ocorre em cerca de um terço das mulheres infectadas, friabilidade cervical, edema e pequenas hemorragias da mucosa após traumatismos mínimos (figura 4) (10, 23, 81, 92, 107, 113).



Figura 4. Cervicite causada por *C. trachomatis*.

Cedido por Ballard *et al.*

Em cerca de 70% dos casos é assintomática, podendo propagar-se ao aparelho genital superior, originando sequelas graves a nível do sistema reprodutor (7, 10, 14, 23, 79, 92, 94, 107, 110).

A ascensão da infecção do colo do útero pode originar um episódio de salpingite, acompanhada ou não de endometrite, normalmente designando-se de doença inflamatória pélvica (DIP) (23, 71, 81, 92, 110).

A DIP é a principal responsável pela elevada taxa de morbilidade e custos económicos e físicos na mulher resultantes da infecção por *C. trachomatis*, uma vez que pode resultar em gravidez ectópica, infertilidade e dor crónica pélvica (10, 92, 93, 110).

A DIP está associada a infecções sexualmente transmitidas em mais de 80% dos casos (7) e manifesta-se essencialmente por cervicite mucopurulenta, dor abdominal, friabilidade do cérvix ao toque, náuseas, febre superior a 38°C, hemorragias entre o ciclo menstrual e/ou durante a relação sexual, urina asséptica negativa e mais de 10 leucócitos por campo numa coloração de Gram do exsudado cervical (10, 23, 71, 92, 93).

As recorrências de DIP são bastante comuns e podem ser devidas à persistência da infecção por *C. trachomatis* devido a um tratamento incompleto ou a reinfeção. A recorrência de DIP ocorre pela ascensão da infecção às trompas de Falópio já danificadas (81, 93). A cada episódio repetido de DIP duplica o risco de alterações das trompas e consequentemente aumenta o risco de infertilidade e gravidez ectópica (10, 29, 71, 83, 92, 93, 127).

Ainda em relação às complicações da infecção por *C. trachomatis*, cerca de 43% dos casos de gravidez ectópica podem ser devidos a infecção por este microrganismo (10, 92, 93, 94, 127), o qual pode ainda invadir o fígado e originar uma peri-hepatite, que se denomina síndrome de Fitz-Hugh-Curtis, que se caracteriza por uma reacção inflamatória aguda da cápsula hepática e peritoneu, sem envolver o parênquima hepático. Pode ocorrer em cerca de 5 a 15% das mulheres com salpingite diagnosticada através de laparoscopia (7, 71, 81, 92, 110).

Na mulher grávida a infecção por *C. trachomatis* pode causar algumas complicações como aborto, morte fetal, rotura prematura de membranas, corionamionite, parto prematuro e recém-nascido de baixo peso (83, 92, 93).

O diagnóstico e tratamento de gestantes infectadas por *C. trachomatis* e dos seus parceiros sexuais previnem as complicações durante a gravidez e no recém-nascido (10).

1.2.2.2.1.1 Infecção neonatal

A infecção neonatal por *C. trachomatis* ocorre durante a passagem do recém-nascido, quando este atravessa o canal de parto, ocorrendo em aproximadamente 60% dos recém-nascidos de mães infectadas ou mais raramente, se houver rotura prematura de membranas (29). Cerca de um terço dos recém-nascidos infectados desenvolvem conjuntivite designada por *ophthalmia neonatorum* e cerca de um sexto desenvolve pneumonia (7, 71, 107, 127).

A *ophthalmia neonatorum* manifesta-se normalmente, entre o 5º e o 12º dia após o nascimento, mas pode desenvolver-se em qualquer altura até 1 mês de idade (7, 29, 71, 107).

Em casos menos frequentes entre a 4ª e 11ª semana de vida, o recém-nascido pode desenvolver uma pneumonia e/ou otite, embora esta última seja muito rara (7, 29, 71, 107).

1.2.2.2.2 No homem

Apesar do maior impacto da infecção por *C. trachomatis* ocorrer predominantemente no sexo feminino, a prevalência da infecção é semelhante em ambos os sexos (56).

C. trachomatis é a maior causa de uretrite não gonocócica no homem (cerca de 42%) seguida de *Mycoplasma genitalium* e *Ureoplasma spp* (cerca de 10% e 30% respectivamente), podendo este microrganismos originar também uma uretrite pós-gonocócica (7, 10, 63, 107).

Quando sintomática, a infecção por *C. trachomatis* no homem, manifesta-se por corrimento uretral escasso mucoso, traduzindo-se frequentemente apenas por gota uretral matinal, observada quando é aplicada pressão da base do pénis à glande (figura 5) (76). Pode ser acompanhada ou não de inflamação do meato, podendo originar

disúria (ardor na micção), polaquiúria, hematúria, dor perianal, dor testicular, linfadenopatia inguinal ou mesmo febre. No entanto, estes dois últimos sintomas são mais raros (7, 10, 15, 107, 130).



Figura 5. Uretrite num homem causada por *C. trachomatis*.

Cedido por Ballard *et al.*

Frequentemente, as uretrites são causadas simultaneamente por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (58).

A infecção por *C. trachomatis* pode ascender a partir da uretra e originar infecções nos testículos (orquite), epidídimo (epididimite) e próstata (prostatite) e também infertilidade, embora muito mais raramente do que na mulher (10, 56, 71, 107, 130).

1.2.2.2.3 Em ambos os sexos

Em ambos os sexos pode ocorrer faringite (10, 92, 112) e proctite (infecção do recto), a qual pode originar dor e/ou hemorragia rectal acompanhada ou não de corrimento purulento (10, 23).

Pode também ocorrer síndrome de Reiter ou artrite reactiva adquirida sexualmente (SARA), uma complicação de infecção por *C. trachomatis*, definida pelo *American College of Rheumatology* como uma artrite de mais de um mês de duração, que ocorre em associação com uma uretrite e/ou cervicite e conjuntivite. Estas complicações são mais frequentes no sexo masculino (10, 48, 71, 81, 120, 133).

1.2.2.3 Tratamento

O tratamento de infecção por *C. trachomatis* depende do local de infecção, da idade do doente e de ser ou não complicação da infecção inicial. O tratamento também difere no caso de gravidez (21, 76).

Podem usar-se vários esquemas terapêuticos, sendo que as infecções urogenitais não complicadas podem ser tratadas com doxiciclina (7 dias) ou a azitromicina, via oral, embora esta última tenha a vantagem de ser eficaz em dose única, devendo ser sempre preconizada a terapêutica sistemática do(s) parceiro(s) sexuais e a abstinência sexual (incluindo oral e anal) durante sete dias após o tratamento (21, 76, 95, 111).

A monitorização pós terapêutica só é necessário quando os sintomas persistem ou se suspeita de uma reinfecção (21, 76, 91, 95, 111).

A doxiciclina, minociclina e ofloxacina estão contra-indicadas na gravidez, pelo que se utiliza a eritromicina ou a amoxicilina para o tratamento de infecção por *C. trachomatis* nesta situação, sendo que a monitorização durante a gravidez está recomendada três semanas após o tratamento (21, 76, 91, 111).

O recém-nascido com *ophthalmia neonatorum* e/ou pneumonia deve ser tratado com eritromicina por via sistémica (21, 29, 76, 91).

A doença inflamatória pélvica pode ser tratada em ambulatório, mas a hospitalização é requerida quando a doente está grávida, quando ocorre intolerância à terapêutica do ambulatório (náusea, vômitos), quando a situação clínica é grave (febre elevada, abscesso tubo-ovário), em presença de imunossupressão ou por não cumprimento da terapêutica em ambulatório (21, 76, 91).

Existem vários protocolos terapêuticos, sempre prevendo a etiologia polimicrobiana desta afecção clínica, o que obriga à associação de vários antibióticos.

1.2.3 Linfogranuloma venéreo

O linfogranuloma venéreo (LGV) é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pelos serótipos L1, L2, L2a, L2b e L3 de *C. trachomatis* (22, 68, 71, 107).

As estirpes de LGV são mais virulentas e mais invasivas do que os outros serótipos de *C. trachomatis* igualmente transmitidas por via sexual, uma vez que têm tropismo para o tecido linfático (22, 68, 107).

1.2.3.1 Epidemiologia

O LGV é endêmico em áreas tropicais da África, Ásia, América do Sul e Caraíbas e raro nos países industrializados. No entanto, ultimamente têm-se registado alguns casos, na Europa (22, 58, 81, 122, 128) e nos Estados Unidos da América (81, 85, 122), especialmente entre homens que têm sexo com homens (HSH), com co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e pelo vírus da hepatite C (17, 54, 58, 68, 71, 140).

O primeiro alerta para casos de infecção por LGV na Europa surgiu em Dezembro de 2003, na cidade de Roterdão na Holanda, onde foi identificado um grupo de 13 HSH com esta patologia. Estes 13 casos foram diagnosticados entre Abril e Novembro de 2003, tendo sido relatados às autoridades locais. Foi depois enviado um alerta para a EWRS (*Early Warning and Response System*), para o ESSTI (*European Surveillance of Sexually Transmitted Infections*) e para o CDC. Nos 17 meses seguintes, 92 casos foram identificados em HSH naquele país (19, 124).

Subsequentemente ao alerta inicial, foram diagnosticados vários casos de LGV na Bélgica (125), em França (44), na Suécia (8, 102), na Alemanha (12), em Espanha (75), no Reino Unido (129), em Portugal (17), no Canadá (60), na Austrália (116) e nos Estados Unidos da América (85).

A doença na sua forma clássica, afecta três vezes mais o sexo masculino, populações com baixo nível sócio-económico, trabalhadoras do sexo, HSH e indivíduos que visitaram países onde o LGV é endêmico (22, 81, 140).

1.2.3.2 Manifestações clínicas

A manifestação mais comum é uma linfadenopatia inguinal e/ou femoral unilateral. No local da inoculação pode ocorrer uma úlcera genital ou uma pápula de pequenas dimensões (figura 6) (22, 58, 68, 121).

O LGV passa por três fases ou estádios, designados de estágio primário, secundário e terciário (22, 68).

O estágio primário, também designado de acidente primário de inoculação, está presente em apenas um pequeno número de casos. Após o período de incubação, de 3 a 30 dias, desenvolve-se uma pequena úlcera ou pápula indolor, não endurecida, no local de inoculação, a qual pode passar despercebida (22, 54, 68, 71, 81, 107).

O estágio secundário, quando ocorre, inicia-se 2 a 6 semanas após a lesão primária, surgindo sinais inflamatórios nos gânglios linfáticos regionais com aumento do seu tamanho, no ânus ou no recto, os quais podem fistulizar e eliminar exsudado purulento (54, 68, 81, 107).

Em ambos os sexos, a síndrome inguinal é acompanhada de febre, em geral elevada, com outras manifestações geralmente exuberantes como prostração e emagrecimento, podendo também ocorrer proctite, com a sua respectiva sintomatologia (22, 68, 81, 107, 140).

A grande maioria dos doentes não ultrapassa a fase de linfadenopatia, pela cura espontânea ou pelo tratamento, pelo que as complicações tardias não são frequentes (81).

O estágio terciário corresponde às complicações tardias que, quando surgem, resultam de uma linfangite proliferativa persistente genital e anorrectal, com fibrose e obstrução linfática, elefantíase do pénis e do escroto (raramente), da vulva e do períneo. Pode ainda haver o desenvolvimento de abscessos e fístulas rectais (54, 68, 81).

Em muitos dos casos diagnosticados na Europa, Estados Unidos da América, Canadá e Austrália, os indivíduos não apresentavam um quadro sintomatológico clássico com a presença de bubões e úlcera genital não dolorosa, verificando-se antes a existência de sintomas gastrointestinais como obstipação, exsudado mucóide anal e proctite hemorrágica, isto é, sintomatologia anorrectal, embora também se tenha verificado a existência de vários casos assintomáticos, tendo-se verificado a presença do serótipo L2b nestes casos (58, 124).



Figura 6. Úlcera genital e linfadenopatia inguinal devido a infecção por LGV.

Cedido por Ballard *et al.*

1.2.3.3 Tratamento

A terapêutica pode ser efectuada com os antibióticos utilizados no tratamento de infecções urogenitais não complicadas, tais como doxiciclina ou eritromicina, mas durante 21 dias (22, 81, 91). Na grávida com LGV, a infecção deve ser tratada com eritromicina (22, 81).

Todos os indivíduos que tiveram contacto com um parceiro sexual infectado com LGV nos últimos 60 dias, devem ser examinados e testados para infecção urogenital por *C. trachomatis* e tratados (22, 81, 91).

A cirurgia reparadora está indicada no tratamento das consequências tardias, nomeadamente abscessos rectais e fístulas (81).

1.3 Diagnóstico laboratorial de *C. trachomatis*

O diagnóstico tradicional de *C. trachomatis* assenta na cultura celular, embora os testes para detecção do antígeno de *C. trachomatis* sejam utilizados essencialmente pelo seu baixo custo quando comparado com o da cultura e pelo menor tempo na obtenção dos resultados. Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs), outro tipo de testes utilizados no diagnóstico laboratorial de *C. trachomatis*, apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade na detecção da infecção (10, 20, 34, 90, 112).

1.3.1 Testes culturais

A cultura celular é considerada a técnica *gold standard* no diagnóstico de *C. trachomatis* em infecções urogenitais, pela sua especificidade ser próxima de 100% (7, 10, 90).

A cultura de *C. trachomatis* consiste na inoculação da amostra em monocamadas de células McCoy, BGMK ou HeLa 229 (10).

Se existirem corpúsculos elementares na amostra, estes infectam as células e crescem, originando inclusões intra-citoplasmáticas em 48 a 72 horas, as quais contêm um grande número de corpúsculos elementares e reticulares, podendo ser visualizados por imunofluorescência com a ajuda de anticorpos monoclonais fluorescentes anti-MOMP ou anti-LPS. Estas inclusões podem ser visualizadas também com coloração de Giemsa ou iodo (7, 10, 26, 71, 90).

O uso de anticorpos fluorescentes anti-LPS permitem reconhecer a espécie e os anticorpos fluorescentes anti-MOMP permitem reconhecer os serótipos de *C. trachomatis* (10, 20, 71).

A visualização directa das inclusões intra-citoplasmáticas garante uma especificidade próxima de 100%. Outras vantagens são a baixa probabilidade de contaminação e a preservação do microrganismo para testes de genotipagem e de sensibilidade a anti-microbianos, estes ainda não necessários na rotina laboratorial, uma vez que *C. trachomatis* não apresenta resistência aos antibióticos utilizados no seu tratamento (10, 90, 112).

Para os testes culturais é necessário recolher células infectadas com o microrganismo (células epiteliais colunares ou escamosas), uma vez que *C. trachomatis* é um agente intracelular obrigatório (10).

A colheita de células para o diagnóstico de *C. trachomatis* pode ser efectuada com zaragatoas de plástico ou metal e as pontas podem ser de algodão, rayon, dacron ou de alginato de cálcio. As zaragatoas de madeira não devem ser utilizadas, devido à sua toxicidade (10, 20, 26, 90).

Para a colheita endocervical, a zaragatoa deve ser inserida na junção endocervical, com cerca de 1 a 2 cm de profundidade, rodada no sentido contrário aos

ponteiros do relógio, durante 15 a 30 segundos e retirada sem tocar na mucosa vaginal (10).

As colheitas uretrais femininas e masculinas são efectuadas introduzindo uma zaragatoa uretral cerca de 1 cm ou 3 a 4 cm na uretra no caso de mulheres e homens, respectivamente, rodando no sentido contrário aos ponteiros do relógio. Em ambos os sexos, as amostras uretrais devem ser colhidas uma a duas horas após a última micção (10, 20).

A colheita de amostras da conjuntiva, rectais, faríngeas, tal como nas amostras endocervicais e uretrais, deve ser efectuada com zaragatoa de modo a obter o maior número de células (10, 26).

Após a colheita a amostra deve ser colocada em meio de transporte e refrigerada à temperatura de 2 a 8°C até transporte para o laboratório. Nesta temperatura, o tempo entre a colheita e o processo laboratorial de cultura celular não deve exceder as 24h. Contudo, se as amostras não forem processadas de imediato, podem ser congeladas a -70°C em meio de transporte. Alguns estudos referem que no processo do congelamento se perde cerca de 20% de viabilidade celular (10, 20, 26).

As amostras devem ser transportadas num meio de transporte, por exemplo o 2-sucrose fosfato (2SP) ou sucrose-glutamato fosfato (0,2 M sucrose fosfato) (10, 26, 90).

Apesar dos testes culturais serem ainda hoje os testes *gold standard* para o diagnóstico de uma infecção por *C. trachomatis*, podem ter uma baixa sensibilidade quando o número de células na amostra é pequeno (37 a 85%), além de ser sempre necessária uma colheita endocervical para obtenção de células e a refrigeração da amostra durante o transporte para o laboratório para garantir a viabilidade do microrganismo. Actualmente, estes testes são apenas efectuados em laboratórios de referência por serem dispendiosos, demorados (cerca de 3 a 7 dias) e necessitarem de infra-estruturas de laboratório, instrumentos e pessoal qualificado (7, 10, 20, 90, 112).

A cultura está, no entanto, recomendada no estudo de amostras rectais, da conjuntiva e da orofaringe, tanto de mulheres como de homens sintomáticos, amostras de crianças e de raparigas em idade pré-puberdade e no caso de amostras em casos de investigação de abuso sexual (10, 20, 90, 112).

1.3.2 Testes não culturais

Os testes não culturais, também designados de testes de detecção do antígeno de *C. trachomatis*, mais utilizados são o teste ensaio imunoenzimático (EIA) e o teste da imunofluorescência directa (DFA), mas também podem ser utilizados os testes rápidos (*point-of-care test*), os quais ultimamente apresentam boa sensibilidade e especificidade (10).

Os dois primeiros baseiam-se na detecção dos antígenos MOMP e LPS de *C. trachomatis* e os últimos derivam do teste EIA (10, 20, 26, 112).

Apesar de na sua maioria, os testes EIA e os DFA terem sido substituídos pelos testes de amplificação dos ácidos nucleicos, há ainda alguns laboratórios que os continuam a utilizar, pelo seu baixo custo (90).

1.3.2.1 Teste ensaio imunoenzimático (EIA)

O teste ensaio imunoenzimático (EIA) utiliza anticorpos anti-LPS marcados com um enzima que estão fixos a uma fase sólida (como microplacas, esferas, tubos) e que vão reagir com o LPS da membrana dos corpúsculos elementares de *C. trachomatis* (10, 20).

Quando os anticorpos anti-LPS se ligam ao LPS dos corpúsculos elementares, o enzima converte o substrato cromogénico num composto colorido e essa alteração de cor é registada num espectrofotómetro. Em alternativa, pode ser utilizado o anticorpo anti-LPS marcado com fluoresceína, obtendo-se neste caso um substrato fluorescente quando o anticorpo se liga ao LPS, podendo esta fluorescência ser observada em microscópio de fluorescência (10, 20, 34, 90). O processo manual desta técnica dura cerca de 3 a 4 horas, podendo ser automatizada (7, 10, 20, 34, 112).

Nesta técnica devem ser utilizadas apenas amostras endocervicais e uretrais. As amostras rectais não são recomendadas, pois podem ocorrer reacções cruzadas com bactérias fecais (20, 90). No entanto, podem utilizar-se amostras da conjuntiva, quando os testes culturais não estão disponíveis (90).

As amostras devem ser colhidas com zaragatoa e podem ser mantidas à temperatura ambiente até 24 horas. Quando este tempo é ultrapassado podem ser

mantidas entre 2°C a 8°C, mas devem ser sempre trabalhadas em menos de 5 dias e nunca podem ser congeladas (10, 20, 26).

A desvantagem da técnica EIA é o facto dos anticorpos anti-LPS poderem reagir com outras espécies de *Chlamydia* e com outras bactérias de coloração de Gram negativa, produzindo resultados de falsa positividade e em consequência originar uma diminuição da especificidade do teste (97%). Outra grande desvantagem é a sua baixa sensibilidade (62-72%) (10, 20, 34, 71, 90, 112).

Para aumentar a especificidade, os resultados positivos devem ser confirmados com um teste confirmatório na presença de anticorpos monoclonais específicos para o LPS, que irão competir com os epítomos de ligação aos anticorpos de detecção do LPS (10, 20, 26, 34).

A especificidade do teste pode ser aproximadamente 97% sem teste confirmatório e superior a 99% com teste confirmatório (10, 26, 71, 90, 112).

Pela variação dos valores da especificidade, um teste EIA não deve ser utilizado sem confirmação, especialmente em populações com baixa prevalência de infecção, pois neste grupo têm um baixo valor preditivo positivo (10, 26, 37).

1.3.2.2 Teste de imunofluorescência directa (DFA)

O teste de imunofluorescência directa (DFA) consiste na identificação de corpúsculos elementares através de anticorpos monoclonais fluorescentes (20, 88).

São utilizados anticorpos monoclonais anti-MOMP ou anti-LPS marcados com fluoresceína que são adicionados a um esfregaço em lâmina que contém a amostra fixada (20, 88, 90). Na presença de corpúsculos elementares na amostra, os anticorpos ligam-se às moléculas de MOMP ou LPS da membrana dos corpúsculos elementares e emitem fluorescência que pode ser observada num microscópio de fluorescência (10, 20, 88, 90, 112).

Os anticorpos anti-LPS podem reagir com outras bactérias não-*Chlamydia* e com as espécies *C. pneumoniae* e *C. psittaci*, pelo contrário os anticorpos anti-MOMP são específicos de espécie e são os preferidos para o teste DFA para a pesquisa de *C. trachomatis* (10, 20, 26, 90).

A sensibilidade do teste DFA ronda os 80-90% e a sua especificidade os 98-99% (26, 37, 90).

Este teste permite detectar a infecção por *C. trachomatis* em amostras endocervicais, uretrais, rectais, conjuntivais, faríngeas e respiratórias de recém-nascidos (10, 20, 37, 90). O esfregaço deve ser feito imediatamente após a colheita ou a amostra deve ser enviada ao laboratório para a realização do esfregaço em menos de 24h. Após a realização e fixação do esfregaço, este pode ser mantido a 4°C, mas deve ser enviado ao laboratório em menos de 7 dias. Para uma conservação longa, os esfregaços podem ser mantidos a -20°C durante 2 anos (10, 20, 26).

Apesar do teste DFA ser um teste relativamente rápido (cerca de 30 minutos), a avaliação microscópica requer treino e experiência técnica para avaliar a presença de corpúsculos elementares e conseguir distingui-los de material inerte fluorescente. Além disso, é necessário que o laboratório possua um microscópio de fluorescência (10, 20, 26, 112).

O número mínimo de corpúsculos elementares para um resultado positivo de DFA é normalmente de 10 corpúsculos elementares numa preparação (10). A sensibilidade do teste aumenta quando a amostra é transportada em meio de transporte e centrifugada antes de se proceder ao teste (10, 26).

Uma vantagem do teste DFA em relação ao teste EIA é que, além do diagnóstico de *C. trachomatis*, o teste DFA permite também detectar a presença de células epiteliais, podendo ser assim avaliada a qualidade da amostra (10, 20, 112).

1.3.2.3 Testes rápidos (*point-of-care test*)

Existem também no mercado testes rápidos ou *point-of-care test* que são de baixo custo, adaptados para a execução numa consulta sem necessidade de equipamento sofisticado de laboratório, com um resultado qualitativo ao fim de 30 minutos. Estes testes são uma mais valia para a instituição imediata de tratamento ao doente, ainda no momento da consulta e para serem utilizados em países sem equipamento laboratorial disponível (7, 10, 20, 26, 90).

Estes testes utilizam os princípios de um teste EIA numa membrana de captura ou imunodifusão de látex e estão adequados para amostras endocervicais, uretrais e amostras de urina masculina (10, 90).

Apresentam uma sensibilidade e especificidade de 52 a 85% e 96,7%, para exsudados endocervicais, de 65 a 85% e 92,9% para exsudados uretrais masculinos e aproximadamente 90,9% e 97% para amostras de urina masculina, respectivamente (10, 20, 90).

Podem ser utilizados em locais onde existe probabilidade dos doentes não voltarem para o tratamento e em populações onde a demora do tratamento poderá significar transmissão de IST (10, 20, 26, 90).

1.3.3 Testes de detecção de ácidos nucleicos

O desenvolvimento, na década de 80, de testes de detecção dos ácidos nucleicos, empregando técnicas de biologia molecular, foi o avanço mais importante no campo de diagnóstico laboratorial de *C. trachomatis* desde o isolamento do microrganismo no ano de 1959, em cultura de células *in vitro*, pela facilidade na obtenção e encaminhamento de amostras clínicas para o diagnóstico, pela sua elevada sensibilidade e por não ser necessária a viabilidade do microrganismo. Acresce o facto de poderem ser efectuados em amostras de urina, essencial para o rastreio em massa destas infecções (7, 10, 20, 26, 71, 112).

Os testes de detecção dos ácidos nucleicos podem dividir-se em dois grandes grupos, os testes de hibridação e os testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs).

As técnicas de detecção dos ácidos nucleicos têm por objectivo a pesquisa de sequências de MOMP, de plasmídeo críptico ou de RNA ribossomal (rRNA) de *C. trachomatis*, tendo uma sensibilidade superior a todos os outros testes descritos anteriormente (10, 34, 112).

Com estes testes, é possível detectar uma infecção com apenas poucas cópias de DNA de *C. trachomatis*, contrariamente aos testes não culturais (DFA ou EIA), onde o limite de detecção se situa entre 10 a 100 microrganismos para uma amostra com resultado positivo (10, 38).

Esta vantagem tornou possível o uso de amostras não invasivas como a urina ou exsudados vaginais, não sendo estas amostras viáveis para os testes culturais (10, 20, 26, 106, 136).

Este tipo de amostras é ótimo na triagem de populações assintomáticas, visto que podem ser colhidas pelo próprio, dispensando o exame pélvico na mulher e a zaragatoa uretral no homem (10).

Em relação à urina a colheita deve ser do primeiro jacto (*firsts voids*), pois contém a maior concentração de células infectadas por corpúsculos elementares. Deve ser obtida entre uma a duas horas após a última micção e o limite de volume de urina aceitável situa-se entre 5 a 40 ml nos homens e 10 a 50 ml nas mulheres (10, 26, 139).

Após a colheita do primeiro jacto de urina para um recipiente asséptico, esta pode ser conservada à temperatura ambiente (25°C) quando o tempo de realização do teste é inferior a 24 horas ou conservada até durante 5 dias, entre 2 a 8°C. À temperatura ambiente, o pH da urina diminui e o conteúdo de ureia desnatura rapidamente o DNA presente, especialmente em temperaturas acima dos 25°C (10, 20). Para uma conservação longa, a urina pode ser mantida a -20°C durante 60 dias após a colheita ou a -70°C até durante 2 anos (20).

Alguns estudos revelam que determinados inibidores lábeis são eliminados quando a amostra de urina é congelada a -20°C antes de um teste de detecção de ácidos nucleicos, aumentando a sensibilidade do teste (10, 20).

Relativamente aos exsudados vaginais, vários estudos revelam que estas amostras, quando utilizadas para técnicas de amplificação de ácidos nucleicos são tão sensíveis como as amostras endocervicais em testes culturais (10, 27, 90, 106, 136).

Os exsudados vaginais ou endocervicais, quando utilizados para os testes de detecção dos ácidos nucleicos, devem ser colhidos e colocados em meio de transporte (exemplo: 2SP). Podem ser mantidos até 5 dias a uma temperatura entre 2° e 27°C ou ser conservados até 60 dias à temperatura de -70°C (20).

1.3.3.1 Testes de hibridação dos ácidos nucleicos

Os testes de hibridação de ácidos nucleicos (*DNA hybridization probe*) têm sido utilizados desde da década de 90, em substituição aos testes imunoensaios enzimáticos, em laboratórios de grandes rotinas laboratoriais (10, 26).

Existem dois testes aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para a detecção de *C. trachomatis*, o PACE2 e o Hybrid Capture II (7, 10, 20, 26, 37, 90, 112). Em ambos os testes é possível a detecção simultânea de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (20).

O teste PACE 2 (GenProbe, San Diego, CA) foi provavelmente o teste de hibridação dos ácidos nucleicos mais utilizado para detectar *C. trachomatis* em laboratórios de rotina nos Estados Unidos, antes do advento dos testes de amplificação dos ácidos nucleicos. Este teste utiliza uma sonda de DNA quimioluminiscente que hibrida com uma sequência específica de espécie do gene que codifica o rRNA 16S de *C. trachomatis* (7, 10, 20, 37, 90, 112).

O teste Hybrid Capture II (Digene Corporation, USA) utiliza sondas de RNA específicas para sequências do DNA genómico e do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* (7, 20, 26).

A sensibilidade e especificidade é aproximadamente 79,3% e 99% para o teste PACE 2 e 97,4% e 98,2% para o teste Hybrid Capture II, respectivamente (10, 71, 90).

1.3.3.2 Testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs)

Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs) são actualmente os testes preferidos para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*, pelo seu elevado desempenho, detectando rapidamente a presença de *C. trachomatis* na amostra, independentemente da viabilidade do microrganismo ou do estado de conservação da amostra (7, 10, 20, 34, 71, 90, 109, 112).

Têm normalmente uma sensibilidade superior a 90% e uma especificidade de mais de 99% em amostras não invasivas colhidas pelo próprio, como a urina (7, 10, 20, 37, 43, 71).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos têm contudo algumas limitações, como o custo elevado, a monitorização da terapêutica, a reprodutibilidade, etc.

O seu custo elevado tem sido ponderado por alguns laboratórios pois, apesar de mais dispendiosos do que outros testes não culturais, mas de menor custo do que a cultura, o seu custo-benefício é elevado. A morbilidade associada e a possibilidade de se poderem utilizar amostras não invasivas, permitiu uma maior aceitabilidade da população em geral, pelo que foi possível a criação de rastreios em populações com elevado risco de contrair IST, com a possibilidade de se utilizar amostras não invasivas (10, 20, 27, 112).

Também têm ocorrido alguns problemas relativos à reprodutibilidade, especialmente quando a prevalência da infecção na população estudada é <5%. Nestes casos em cerca de 50% dos casos, quando repetidos com o mesmo teste, não dão os mesmos resultados (43).

Uma outra limitação reside na capacidade destes testes detectarem a presença de *C. trachomatis* em apenas uma única cópia de DNA ou RNA presente na amostra, não representando sempre uma infecção actual, pois pode também ser devido à presença de DNA residual de uma infecção prévia ou à presença de DNA por contaminação laboratorial (43). Esta limitação contribui para o facto da cultura ainda não ter sido substituída por estas técnicas como um padrão legal para o diagnóstico forense (10).

Também pela razão acima mencionada, não devem ser utilizados na monitorização da terapêutica, pois alguns estudos relatam que três semanas após o termo do tratamento, podem ainda existir ácidos nucleicos residuais, não infectantes, que podem originar um teste NAAT positivo (10, 27, 37, 87).

Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos também têm tido limitações na diminuição da sua sensibilidade, quando ocorre a presença de determinados inibidores presentes nas amostras de urina. Os inibidores podem ser estrogénios, nitratos, cristais e hemoglobina, que ocorrem de forma imprevisível na amostra e alteram a reacção do enzima polimerase (20, 71).

Para ultrapassar esse obstáculo, a amostra de urina pode ser congelada antes do teste, o que parece eliminar estes inibidores. Outra solução é a utilização de controlos de amplificação (*primers* da β -globina humana), também designados de controlos internos (10, 20, 27, 34, 38).

Os NAATs incluem a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), de LCR (*ligase chain reaction*), de SDA (*strand displacement amplification*) e de TMA (*transcription mediated amplification*).

As técnicas de PCR, de LCR e de SDA amplificam sequências nucleotídicas do plasmídeo críptico e/ou do DNA genômico de *C. trachomatis*, enquanto que a técnica de TMA está baseada na amplificação de rRNA. Algumas destas técnicas podem ser automatizadas, contribuindo para serem utilizadas com sucesso, no rastreio de grandes populações (10, 26, 71).

A maioria dos NAATs comerciais está habilitada pela FDA para o diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de urina masculinas, amostras endocervicais e amostras uretrais masculinas (10, 20, 27, 37).

Segundo alguns autores (10, 20, 39, 90), os exsudados vaginais e da conjuntiva também podem ser utilizadas, embora estas aplicações estejam ainda a ser estudadas pela FDA.

As amostras rectais e faríngeas têm uma sensibilidade limitada nos testes NAATs e não estão recomendados pela FDA, mas no caso do diagnóstico de infecção por LGV é esta a técnica e o tipo de amostra preconizado (1, 20, 22, 37, 109, 128).

As técnicas de PCR, SDA e TMA irão ser detalhadas de seguida. A técnica LCR foi utilizada até 2002, altura em que foi retirada do mercado por apresentar pouca especificidade, pondo em causa a validade dos resultados positivos das amostras testadas com este teste (16, 34, 43, 90, 101).

1.3.3.2.1 PCR (*Polymerase chain reaction*)

A técnica mais conhecida dos NAATs é a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) que utiliza duas sequências sintéticas oligonucleotídicas, designadas de *primers*, complementares às regiões flanqueadas do segmento específico presente no microrganismo alvo, sendo necessário também desoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTP's) para sintetizar a nova cadeia, enzima DNA Taq polimerase, tampão para o enzima e cofactor $MgCl_2$ (4, 10, 20).

As cópias são originadas por ciclo térmicos, constituídos por desnaturação, emparelhamento (*annealing*) e extensão, que se repetem originando segmentos de DNA genómico ou de plasmídeo em milhões de cópias idênticas (4, 10, 20, 90, 112).

As cadeias novas, designadas de produtos de PCR, podem ser visualizadas por electroforese em gel de agarose a 1,5% ou através da hibridação com sondas específicas (10, 112).

A sensibilidade e especificidade da técnica de PCR dependem dos *primers* utilizados, da técnica de referência, do tipo de amostra, da população analisada, da preparação da amostra e do método de detecção do produto amplificado e da presença de inibidores (112). A técnica de PCR pode ser específica de género ou espécie, dependendo do design dos *primers* (4, 10).

A sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR é de 80,3 a 91,7% e de 99,4 a 99,8%, em amostras endocervicais, de 87,4 a 92,5% e de 95,2 a 98,8% em amostras uretrais masculinas, de 77,7 a 88,9% e de 98,5 a 99,8% em amostras de urina femininas e de 78,5 a 89,4% e de 98,9 a 99,7% em urinas masculinas, respectivamente (10, 20, 27, 37, 90).

A técnica de PCR foi modificada para aumentar a sensibilidade e especificidade da mesma no diagnóstico de *C. trachomatis*, como por exemplo, a técnica de Multiplex PCR, na qual ocorre a amplificação de mais de um segmento de ácido nucleico na mesma reacção, cada um com o seu par de *primers* específico. Numa técnica de Multiplex PCR para a detecção de *C. trachomatis*, usam-se normalmente dois pares de *primers* para amplificar um fragmento do gene *omp1* e um fragmento do gene do plasmídeo críptico (69, 70).

A técnica de Nested-PCR veio, igualmente, melhorar a especificidade e sensibilidade da reacção. Nesta, um segmento de ácido nucleico é amplificado numa primeira etapa de forma abrangente, sendo depois esse produto de PCR utilizado para uma segunda reacção de amplificação, aumentando dessa forma a especificidade da amplificação (10, 20).

O desenvolvimento de uma técnica onde a visualização se faz em tempo real, (Real Time-PCR), foi um grande avanço. Nesta, a visualização dos produtos de PCR em electroforese não é necessária, permitindo evitar contaminações e poupar tempo na

obtenção dos resultados (aproximadamente 2 horas), além de também existir da possibilidade de quantificação e reprodutibilidade nos resultados (4, 49, 50, 88).

A técnica PCR em Tempo Real utiliza, além de *primers*, sondas de DNA que emitem fluorescência à medida que o DNA de cadeia dupla é sintetizado e a qual é medida e relacionada directamente com a quantidade de DNA amplificado (4, 49).

Tem ainda a vantagem de se poderem utilizar diversos *primers* e sondas específicas, transformando-se uma técnica PCR em Tempo Real numa técnica de Multiplex PCR em Tempo Real. No caso específico de *C. trachomatis*, pode pesquisar-se no mesmo tubo de reacção sequências do fragmento de MOMP e do fragmento do plasmídeo críptico, com os *primers* e as sondas específicas de cada sequência (4, 49, 50, 73).

1.3.3.2.2 SDA (*Strand displacement amplification*)

A técnica de amplificação por deslocamento da cadeia (SDA) é também semelhante à técnica de PCR. No entanto, além de um enzima DNA polimerase, utiliza também enzimas de restrição (90). O teste é isotérmico e utiliza vários *primers*, uns que definem o local de restrição e outros que são específicos para o fragmento de DNA a ser identificado (10, 37, 90).

A sensibilidade pode variar entre 79,9 a 93,6% e a especificidade entre 93,8 a 99,5% (10, 27, 37, 90).

Segundo alguns estudos, esta técnica apresenta uma sensibilidade entre 92,8% e 80,5% em amostras endocervicais e urinárias de mulheres, respectivamente. Nos homens a sensibilidade é de 92,5% em amostras uretrais e 93,1% em amostras de urina, respectivamente (90).

1.3.3.2.3 TMA (*Transcription-mediated amplification*)

A técnica de amplificação mediada por transcrição (TMA) amplifica o gene que codifica para o RNA ribossomal e o alvo de RNA sofre transcrição reversa em cDNA (20, 37, 71, 78).

A vantagem desta técnica é que a reacção de amplificação não requer o uso de um termociclador, é independente do plasmídeo críptico e permite obter cópias de RNA e de DNA (20, 37, 78).

A técnica de TMA tem uma elevada sensibilidade, uma vez que, por cada microrganismo existem centenas de cópias de rRNA (34, 90). A sensibilidade do teste varia entre 95 a 97%, mas a sua especificidade é um pouco mais baixa do que a maioria dos outros NAATs, variando entre 93,8 e 99,1% (20, 27, 37, 71, 78, 90).

1.3.4 Testes serológicos

Nas infecções provocadas por *C. trachomatis* são produzidas imunoglobulinas da classe IgG e da classe IgM (10, 98).

Os anticorpos da classe IgG são detectados, tanto em indivíduos com infecção activa como em indivíduos não infectados. Estes anticorpos parecem persistir durante vários anos e depois apresentam um declínio (98). No entanto, a imunidade pós-infecção por *C. trachomatis*, além de ser apenas parcialmente protectora e de curta duração também parece ser tipo-específica, o que torna as infecções recorrentes comuns (10, 98).

Os anticorpos específicos de classe IgM são os primeiros a surgir numa infecção primária por este microrganismo, embora a reinfeção com um serótipo diferente pareça ser caracterizada pela ausência de resposta por estes anticorpos (10, 98).

Os testes serológicos mais utilizados actualmente para a pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis* são a fixação do complemento (FC), a imunofluorescência indirecta, a imunoensaio enzimático (EIA) e a micro-imunofluorescência (MIF) (10)

Os testes serológicos utilizam antígenos para pesquisar anticorpos da classe IgG e IgM no soro. O soro pode ser testado de imediato e na sua impossibilidade, conservado no frio a 4°C durante alguns dias ou guardado a -20°C por um longo período (10, 20, 81).

O teste de fixação do complemento (FC) detecta anticorpos fixadores do complemento que reconhecem o antígeno LPS e tem sido utilizado no diagnóstico de infecção sistémica por LGV. No entanto, não é utilizado para o diagnóstico de tracoma, conjuntivite de inclusão ou infecção urogenital, nem possui papel significativo no

diagnóstico de infecções neonatais, uma vez que é um teste género-específico e por isso não distingue as espécies de *Chlamydia* (10, 81, 112).

O teste de micro-imunofluorescência (MIF), desenvolvido por Wang (1971), é muito importante na pesquisa epidemiológica de infecções por *C. trachomatis*. É o teste serológico mais sensível e específico, é o único que detecta respostas espécie e serótipo-específicas e que permite a titulação de anticorpos reactivos aos corpúsculos elementares de *C. trachomatis* ou a antígenos individuais, realizando-se a reacção em lâmina e titulando-se por microscopia. Por todas estas características é considerado por muitos autores o teste padrão dos testes serológicos (10, 26, 112). É também o teste escolhido para a detecção de IgM no diagnóstico de infecções pulmonares em crianças (10, 112).

Dos testes ensaios imunoenzimáticos (EIA), utiliza-se normalmente o teste ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) que permite a detecção de anticorpos género-específicos no soro com reactividade para o antígeno LPS de *C. trachomatis*, não distinguindo as espécies de *Chlamydia* (10, 81, 82). Apesar deste teste ser menos sensível do que o teste MIF, na detecção de IgM em pneumonia infantil a sua sensibilidade é semelhante à do teste MIF (10).

Os testes serológicos não devem ser utilizados para diagnosticar uma infecção urogenital por *C. trachomatis*, uma vez que os anticorpos estimulados pela presença do microrganismo são de longa duração e um teste positivo para anticorpos anti-*C. trachomatis* não diferencia uma infecção recente de uma infecção prévia (7, 10, 26, 82, 112).

Vários estudos referem que ocorre a presença do anticorpo IgG anti-*Chlamydia* num largo número de pessoas, sem sinais clínicos e sem evidência epidemiológica e microbiológica de infecção por *C. trachomatis*. Além disso, parece existir uma fraca correlação entre a presença de IgG no soro e a presença de *Chlamydia* no aparelho genital (81, 82) e os anticorpos da classe IgM também podem estar ausentes na infecção activa (29).

A serologia é apenas recomendada em estudos epidemiológicos e no diagnóstico de doença sistémica, como é o caso de pneumonia infantil, salpingite, infertilidade, gravidez ectópica e no diagnóstico de LGV, embora seja de interpretação difícil (10, 26, 28, 29, 35, 68, 81, 112, 126).

Em casos de pneumonia no recém-nascido existe um aumento do título ($>1:32$) de anticorpos da classe IgM. Nestes casos, esta classe de anticorpos pode ser utilizada para detectar pneumonia no recém-nascido pois não atravessa a placenta, não havendo motivo para o aparecimento de resultados de falsa positividade. Já os anticorpos da classe IgG são menos discriminativos, pois podem ser de herança materna ainda em circulação no recém-nascido (20, 26, 82, 112).

Existem alguns estudos que relacionam a presença de anticorpos das proteínas de choque térmico HSP60 e HSP10 com alterações tubulares e doença inflamatória pélvica originadas por *C. trachomatis* (10, 20, 26, 29, 81, 112, 126).

1.3.5 A escolha do teste

Para a escolha do teste a utilizar é importante sabermos a prevalência da infecção na população em estudo, uma vez que esta influencia a sensibilidade e especificidade do teste. É também importante avaliar a amostra mais adequada, o custo do teste em associação ao seu benefício, espaço físico e condições técnicas laboratoriais, entre outros factores (20, 88).

A sensibilidade de um teste é definida pela probabilidade de se obter um teste positivo quando estudamos uma amostra infectada (4) e está inversamente relacionada com a presença de resultados de falsa negatividade (20).

A especificidade de um teste é definida pela probabilidade de se obter um teste negativo quando se estuda uma amostra não infectada (4). Quando a especificidade é baixa, um teste pode ter muitos resultados de falsa positividade (20).

Um teste com uma baixa sensibilidade poderá não conseguir identificar um indivíduo com uma infecção. Como consequência, a infecção não é tratada e pode evoluir para graves consequências. Já um teste com baixa especificidade poderá classificar um indivíduo como infectado, quando na realidade não apresenta infecção. Esta situação poderá causar stress na relação entre o indivíduo e o seu parceiro sexual, bem como um tratamento desnecessário (4).

O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) são também factores importantes na decisão. O VPP é definido pela probabilidade de existir infecção quando o resultado do teste é positivo, já o VPN é a probabilidade de não existir a

infecção quando o resultado do teste é negativo (20). O VPP e o VPN são influenciados pela prevalência da infecção numa dada população e pela especificidade do teste (10, 20, 117).

Um dado teste com uma dada especificidade, quando é utilizado numa população com elevada prevalência de infecção (>5%), o VPP é elevado, enquanto numa população com baixa prevalência de infecção (<5%), este é baixo. Neste último caso, os resultados positivos do teste estudado devem ser confirmados, devido à probabilidade de ocorrerem resultados de falsa negatividade (20, 27, 117).

As normas mais recentes do CDC sobre prevenção e diagnóstico de infecções por *C. trachomatis* recomendam que todos os resultados positivos de testes não culturais numa população com baixa prevalência (<5%) ou baixo risco de infecção sejam confirmados (10, 20). Isto deve-se ao baixo VPP (<90%) dos testes não culturais em populações de baixa prevalência da infecção (10, 108).

A confirmação dos resultados positivos aumenta a especificidade do teste e consequentemente o VPP dos testes não culturais (10, 20).

Segundo o CDC, os resultados dos testes de amplificação de ácidos nucleicos só devem ser confirmados quando a prevalência da infecção é <5% na população estudada e a especificidade do teste NAAT é <98%, uma vez que o valor preditivo positivo deverá ser <90% (10, 20, 27, 37, 108).

Quando existe necessidade de confirmar um resultado positivo, o CDC sugere várias estratégias: (i) testar uma segunda amostra com um teste ou alvo diferente, (ii) testar a amostra original com um teste NAAT diferente ou (iii) repetir o teste original com a amostra inicial (90, 108).

No entanto, algumas estratégias têm limitações. Em relação à estratégia (i) geralmente não se colhem simultaneamente duas amostras do mesmo doente, pelo que este deverá deslocar-se novamente ao estabelecimento de saúde para que se colha uma segunda amostra. Em relação à estratégia (ii), a maioria dos laboratórios não tem capacidade para utilizar duas tecnologias de NAAT diferentes. Por isso, actualmente, a estratégia mais utilizada na maioria dos laboratórios é a estratégia (iii) (108).

Segundo Schachter, os testes confirmatórios são desnecessários, porque quando obtemos num primeiro teste um resultado positivo e no segundo teste um resultado negativo, este pode ser um falso-negativo. Além disso, a repetição do teste adiciona

custos aos que já existem e são limitativos da utilização de um teste NAAT num rastreio (108).

Os testes NAATs são os preferidos pela sua elevada sensibilidade e especificidade e pela possibilidade de se utilizarem em amostras não invasivas (urina e exsudados vaginais). Quando estes não estão disponíveis e quando o custo é um factor determinante, o teste EIA é uma boa escolha, mas os testes de hibridação de ácidos nucleicos são também uma alternativa (10, 20, 90).

1.4 Genotipagem

A genotipagem de *C. trachomatis* deve ser utilizada para (i) diferenciar estirpes, o que pode ser útil na identificação das vias de transmissão sexual, podendo ser utilizada como ferramenta na notificação de parceiros sexuais, (ii) estabelecer possíveis associações entre manifestações clínicas e patogenicidade, (iii) desenvolver uma vacina, (iv) determinar se a infecção actual é persistente ou se é uma re-infecção, (v) prova em tribunal no caso de abuso sexual e (vi) estudos epidemiológicos (34, 36, 40, 49, 79, 97).

A serotipagem convencional de *C. trachomatis* utiliza anticorpos policlonais ou monoclonais específicos dos epítomos da MOMP e permitiu identificar 19 serótipos de *C. trachomatis* (A, Ba, B, C, D, Da, E, F, G, H, I, L1-L3, Ia, J, Ja e K) (11, 36, 62, 79, 80, 99).

Pelos testes utilizados na serotipagem convencional foi possível estabelecer uma relação do serótipo com o tropismo tecido/órgão. Por exemplo, os serótipos B/Ba (ocular), D, E (genital) e L1, L2 (LGV) pertencem todos ao serogrupo B, o serogrupo F-G agrupa os serótipos F e G e o serogrupo C associa os serótipos A, C, H, I, Ia, J, Ja, K e L3 (25, 71, 97, 119).

Actualmente, estes testes já não são utilizados devido ao seu custo e à sua complexidade, uma vez que necessitam de uma cultura celular (36, 62, 80, 97, 99).

Mais recentemente foram desenvolvidos vários testes para a genotipagem de *C. trachomatis* baseados na amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), que identificam os seus genótipos, os quais se baseiam na amplificação do gene *omp1*, que apresenta variações nas sequências nucleotídicas dos domínios variáveis, que permitem distinguir os vários genótipos de *C. trachomatis* (25, 36, 62, 79, 80, 97, 99, 112, 118).

Com estes testes, foi possível a diferenciação do serótipo L2 de LGV em L2a e L2b, por diferenças nas sequências nucleotídicas, sendo este último associado a infecções nos HSH (116).

Os testes que podem ser utilizados para a genotipagem de *C. trachomatis* são PCR-RFLP (PCR e *restriction fragment length polymorphism*), sequenciação, Real Time-PCR, PFGE (*pulse field gel electrophoresis*), RADP (*random amplification of polymorphic*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), entre outros (36, 40, 80, 97).

1.5 Rastreio

Como mencionado anteriormente, o carácter assintomático da infecção por *C. trachomatis* ocorre em cerca de 70% das mulheres e 50% dos homens, aumentando o risco de complicações e transmissão aos parceiros sexuais e ao recém-nascido (3, 7, 127).

As complicações manifestam-se principalmente no sexo feminino, com cerca de 40% das infecções por *C. trachomatis* não tratadas a originarem doença inflamatória pélvica (DIP), que pode ter como consequência infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crónica. Por isso, a detecção e o acompanhamento dos casos assintomáticos permite reduzir os custos do tratamento da infecção aguda e das suas sequelas (3, 46, 104, 110, 127).

Os custos directos e indirectos associados à infecção por *C. trachomatis* são elevados. Os custos directos estão relacionados com a infecção aguda e incluem a consulta pré e pós-tratamento, o diagnóstico e o tratamento. Os custos indirectos estão relacionados com as potenciais sequelas, como a DIP, a infertilidade e gravidez ectópica na mulher e a epididimite no homem (81, 110).

Estima-se que nos Estados Unidos os custos directos associados sejam cerca de 250 milhões de dólares por ano. Adicionando os custos indirectos, o valor aumenta para 24 biliões de dólares por ano (6, 20).

Em relação à DIP e por doente, o custo é de 1.167 dólares sendo por ano gastos cerca de 5,5 biliões de dólares, sem estarem contabilizadas as consequências psicológicas e emocionais (3, 6, 20, 24, 46, 93, 110, 127).

O rastreio para *C. trachomatis* é por isso importante, essencialmente nos grupos populacionais de prevalência elevada (>5%) devido a índices significativos de infecção assintomática, como forma a prevenir a transmissão, as consequências da infecção e os custos económicos, físicos e psicológicos associados (10, 20, 71, 127).

Assegurar as infra-estruturas, o pessoal técnico e os instrumentos adequados para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* é crítico na implementação de um rastreio deste género. É importante também, além da definição da população alvo, definir locais com um elevado número de indivíduos pertencentes a estas populações para estabelecimento de facilidades clínicas a que possa aceder (81, 96).

O rastreio para a infecção urogenital por *C. trachomatis* é actualmente simples, não invasivo e idolor, o que torna acessível e de fácil aceitabilidade pela população no geral (3, 10, 27, 104, 127).

O CDC, USPSTF (*The United States Preventive Services Task Force*), ACOG (*The American College of Obstetricians and Gynecologists*) e AMA (*The American Medical Association*) recomendam a rastreio para *C. trachomatis* anualmente (i) a todas a mulheres sexualmente activas com menos de 25 anos, grávidas ou não grávidas, (ii) a mulheres com mais de 25 anos com elevado risco para infecção por *C. trachomatis*, tal como múltiplos parceiros sexuais, não utilização de contraceptivo de barreira, e/ou que tenham trocado de parceiro sexual nos últimos 90 dias e (iii) a mulheres com cervicite mucopurulenta ou com infecção prévia por *C. trachomatis*, com testes de elevada sensibilidade e especificidade, como é o caso dos NAATs, devendo ser utilizadas amostras de urina ou exsudados vaginais (10, 20, 45, 46, 59, 81, 117).

Na grávida não está devidamente estabelecido qual a melhor altura para se efectuar o rastreio. Alguns estudos recomendam o rastreio no 1º trimestre, que poderá, com o tratamento eficaz, prevenir um parto prematuro e um recém-nascido de baixo peso ou no 3º trimestre, uma vez que irá evitar a transmissão para o recém-nascido durante o parto (20, 45).

O intervalo a considerar entre cada rastreio é desconhecido, estando dependente da idade, comportamentos de risco e prevalência da infecção naquela população, embora a maioria dos estudos recomende o rastreio anual (20, 45).

Devido aos elevados índices de infecção inicial e de re-infecção entre os adolescentes, alguns estudos sugerem que os jovens de alto-risco devem ser rastreados para *C. trachomatis* a cada 6 meses (45, 46).

Não há ainda consenso no que diz respeito à necessidade de rastreio nos homens, mas existem recomendações para que seja efectuado nos homens com comportamentos de risco (os mesmos comportamentos de risco referido anteriormente para as mulheres) e onde exista uma prevalência elevada de infecção na população (37, 41).

Desde 1988 que o CDC mantém programas de rastreio para infecções por *C. trachomatis* em mulheres, nos Estados Unidos. O Reino Unido, a Suécia e a Holanda também estabeleceram o rastreio em mulheres (67, 96). Outros países da Europa incluindo a Letónia, Estónia, Dinamarca, Noruega, Islândia e Austrália têm também preconizado o rastreio em mulheres que se dirijam aos centros clínicos e recomendam a notificação da infecção às autoridades competentes. No entanto, a maioria dos países europeus não efectuam rastreios devido à falta de estudos sobre a prevalência da infecção na população e à inexistência de normas e protocolos, como é o caso de Turquia, Bulgária, Roménia, Malta, Portugal, Eslovénia, Grécia, Espanha, Finlândia, Suíça, Irlanda e Luxemburgo (67).

Segundo o CDC, a prevalência da infecção diminuiu quase metade após o estabelecimento do rastreio em locais onde as mulheres recebem os cuidados de saúde primários (45, 66, 127).

Alguns países onde se efectua o rastreio relatam que desde 1988 até 1998 o número de casos aumentou, o que pode dever-se aos testes de diagnóstico, actualmente mais sensíveis e específicos e pelo aumento do número de testes realizados podendo, pelo menos parte dos casos, não estar relacionado com o aumento real do número de casos de infecção (37, 66).

Alguns estudos realizados nos Estados Unidos, referem que o rastreio em homens poderá ajudar na redução da incidência de doença inflamatória pélvica nas mulheres, sugerindo mesmo a existência de custo-eficácia (37, 41, 66, 110).

Em diversos estudos, o rastreio para infecção por *C. trachomatis* de indivíduos assintomáticos demonstrou ser uma estratégia custo benefício eficaz, particularmente em adolescentes do sexo feminino e masculino, no que diz respeito à prevenção da doença inflamatória pélvica (10, 27, 46, 66, 110).

O rastreio para *C. trachomatis* previne entre 11 a 42% de todos os casos de DIP e as suas sequelas, dependendo da frequência e da duração do rastreio. Estima-se que em cada 83 mulheres que efectuam rastreio, se evita um caso de DIP (46, 47, 66, 110).

Em relação ao LGV, recomenda-se o rastreio anual dos HSH sexualmente activos e de 3 a 6 meses, dos HSH considerados de risco, isto é, indivíduos com múltiplos parceiros sexuais ou que tenham parceiros sexuais com esses comportamentos de risco (103, 122).

O custo-eficácia do rastreio de *C. trachomatis* depende da prevalência da infecção na população a estudar, do método de diagnóstico utilizado e do tratamento escolhido (45).

1.6 Objectivos

O presente estudo teve como objectivos:

- ✓ Identificar a presença de infecção urogenital por *C. trachomatis* em amostras clínicas provenientes de populações de risco para IST, através da utilização de dois NAATs, as técnicas de Multiplex PCR e de PCR em Tempo Real;
- ✓ Identificar os genótipos de *C. trachomatis*;
- ✓ Conhecer a prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG e IgM;
- ✓ Verificar a necessidade de execução do rastreio da infecção urogenital por *C. trachomatis* nas populações estudadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População do estudo

O presente estudo foi realizado em Lisboa, no período compreendido entre Outubro de 2008 e Julho de 2009, tendo sido analisadas amostras provenientes de indivíduos do sexo masculino e feminino de diferentes grupos populacionais: estudantes universitários, homens que têm sexo com homens (HSH), trabalhadoras do sexo, indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) e indivíduos que se deslocaram à Unidade de Doenças Sexualmente Transmitidas (DST) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) para consulta de rastreio e aconselhamento de IST.

As amostras dos estudantes universitários foram obtidas por um rastreio de IST realizado nas Faculdades de Farmácia (FF) e de Medicina (FM) da Universidade de Lisboa, na Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Nova de Lisboa e na Universidade Atlântica (UA), onde foram colhidas amostras de urina e/ou soro aos indivíduos que aceitaram participar no estudo.

As amostras dos HSH resultaram de um rastreio para diagnóstico de infecção por *C. trachomatis*, realizado pela Unidade de DST do IHMT, em parceria com a associação ILGA Portugal (*International Lesbian and Gay Association*), em diversos bares e saunas de Lisboa frequentados por HSH. A alguns HSH que se mostraram interessados colheu-se posteriormente, no laboratório da Unidade de DST do IHMT, uma amostra de soro e/ou exsudado rectal.

As amostras das trabalhadoras do sexo foram obtidas através de um rastreio de IST realizado no Centro de Acolhimento e Orientação à Mulher das Irmãs Oblatas (CAOMIO), tendo sido obtidas amostras de urina e/ou exsudados vaginais (por auto-recolha) e/ou amostras de sangue.

Na consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) foram colhidas amostras de urina de indivíduos do sexo masculino e amostras de urina ou exsudados vaginais de indivíduos do sexo feminino.

As amostras provenientes dos indivíduos da Unidade de DST do IHMT foram colhidas de acordo com a sintomatologia de cada indivíduo, como amostras de urina, exsudados vaginais, uretrais, rectais, orofaríngeos e de úlcera e/ou sangue.

Os indivíduos só foram incluídos no estudo, após terem sido explicados os procedimentos e objectivos do estudo e terem dado o seu consentimento.

2.2 Preparação das amostras

Para a colheita das amostras de urina, foi solicitado aos indivíduos que colhessem o primeiro jacto (~30ml) para um recipiente asséptico, com um intervalo de pelo menos duas horas desde a última micção. Após a colheita, as amostras foram refrigeradas entre 2° a 8°C até serem transportadas para o laboratório da Unidade de DST do IHMT, onde foram congeladas (-20°C) antes do seu processamento. Após descongelamento, as urinas foram centrifugadas (Labofuge200, Heraeus Instruments, Germany) a 6000 rpm durante 20 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento urinário homogeneizado e dividido em alíquotas, um para ser utilizado de imediato e o(s) outro(s) congelado(s) a -70°C.

Os exsudados vaginais, uretrais, rectais, orofaríngeos e de úlcera foram colhidos com zaragatoas de dacron, as quais foram colocadas em meio de transporte 2SP estéril e refrigeradas entre 2° a 8°C até ao transporte para o laboratório, onde foram homogeneizadas em vórtex (MS2 Minishaker, IKA® Works, Inc., USA). A zaragatoa foi posteriormente eliminada e o conteúdo de cada tubo dividido em alíquotas, sendo uma armazenada a -70°C e a outra utilizada de imediato.

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa em tubo sem anticoagulante, em condições de assépsia. Após repouso durante 20 a 60 minutos para retracção do coágulo, a amostra foi centrifugada (Labofuge200, Heraeus Instruments, Germany) a 3000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (soro) foi dividido em alíquotas, sendo uma utilizada de imediato e a outra armazenada a -20°C para futura utilização, se necessário.

2.3 Métodos

No estudo efectuado procedeu-se à identificação de *C. trachomatis* nas amostras de urina e de exsudados (vaginais, uretrais, rectais, orofaríngeos e de úlcera), por pesquisa de DNA desse microrganismo, utilizando-se testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs).

Todas as amostras com uma identificação positiva foram submetidas à técnica de Nested-PCR, com o objectivo de serem sequenciadas para consequente identificação do genótipo presente.

Foi também efectuada a pesquisa e quantificação de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG e IgM no sangue pela técnica de imunofluorescência indirecta.

2.3.1 Identificação de *C. trachomatis* por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

A identificação de *C. trachomatis* foi efectuada em todas as amostras de urina e exsudados, através de uma técnica de Multiplex PCR.

Em algumas amostras de urina e exsudados, foi também efectuada uma técnica de PCR em Tempo Real. Nesta incluíram-se todas as amostras das trabalhadoras do sexo, as amostras dos indivíduos da Unidade de DST do IHMT com resultado duvidoso pela técnica de Multiplex PCR ou cuja pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis* foi reactiva e algumas amostras seleccionadas aleatoriamente, dos estudantes universitários e dos indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM).

2.3.1.1 Extracção de DNA

Procedeu-se à extracção do DNA total, utilizando o sistema comercial *JetquickBlood & Cell Culture DNA Spin Kit* (Genomed, GmbH, Löhne, Germany) em todas as amostras de urina e exsudados anteriormente referidos.

Este *kit* é constituído por colunas de eluição com uma membrana de sílica, protease K e tampões de lavagem e eluição (K1, KX, K2 e AE).

Procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante, excepto em relação às amostras de urina, nas quais se utilizaram 400µl de sedimento urinário em vez dos 200µl recomendados e no passo final, em que se utilizaram 75µl de tampão de eluição, em vez dos 200µl preconizados.

Antes da extracção, adicionou-se a todas as amostras 0,5µl de uma solução de controlo interno (TIB MOLBIOL, Quilaban) para controlo do processo de extracção de DNA e da inibição da amplificação das técnicas de amplificação utilizadas.

O controlo interno (CI) consistiu numa sequência de oligonucleotídeos sintética de 100bp: 5'GTGCTCACACCAGTTGCCGCGGAAAGTATGTGGAATGTTAACACACCCACCACACCCACACACGTGTTGATCAATTTTCGAGATGCGAGCTGCCAAGC-3'.

À mistura amostra/CI adicionou-se 20µl de protease K (20µg/ml) e 200µl de tampão K1, incubando-se 10 minutos em banho-maria (Sub, Grant Instruments, UK) a 58°C. Posteriormente, adicionou-se 200µl de etanol absoluto (Panreac Química S.A.U., Barcelona), misturando de imediato por inversão. Esta mistura foi colocada na coluna e centrifugada (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Germany) a 10.600 rpm durante 1 minuto, sendo o filtrado descartado. Em seguida, aplicou-se 500µl de tampão KX na coluna e centrifugou-se a 10.600 rpm durante 1 minuto. O novo filtrado foi desprezado, adicionou-se 500µl de tampão K2 à coluna e efectuou-se uma centrifugação a 10.600 rpm durante 1 minuto. Para remoção do líquido residual centrifugou-se a 13.000 rpm durante 1 minuto.

O DNA ligado à coluna foi eluído, aplicando no centro da membrana de sílica da coluna 200µl ou 75µl de tampão AE (10 mM Tris-HCl pH 8,5), respectivamente se a extracção tinha sido efectuada a partir da amostra de exsudado ou de sedimento urinário. A coluna incubou à temperatura ambiente durante 5 minutos e posteriormente executou-se outra centrifugação a 10.600 rpm durante 2 minutos.

O DNA obtido foi dividido em alíquotas, sendo uma utilizada de imediato e a(s) outra(s) congelada(s) a -20°C.

2.3.1.2 Técnica de Multiplex PCR

A técnica de Multiplex PCR utilizada no estudo baseou-se em Jalal *et al.* (2006), a qual consiste na amplificação de três alvos diferentes numa mesma reacção.

Para a detecção de *C. trachomatis* utilizou-se dois pares de *primers*, tendo um par como alvo de amplificação o gene *omp1* e outro o gene do plasmídeo críptico. Para o controlo da inibição da amplificação utilizou-se um terceiro par de *primers*, tendo como alvo de amplificação o controlo interno.

As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2. Genes alvo, descrição dos *primers* e tamanhos dos produtos de PCR amplificados, utilizados na técnica de Multiplex PCR para a detecção de DNA de *C. trachomatis*.

Genes Alvo	<i>Primers</i>	Tamanho do produto de PCR amplificado
MOMP	HJ-MOMP-1 5'-GAC TTT GTT TTC GAC CGT GTT-3' HJ-MOMP-2 5'-ACA RAA TAC ATC AAA RCG ATC CCA-3'	218 bp
Plasmídeo críptico (CP)	HJ-plasmid-1 5'-AAC CAA GGT CGA TGT GAT AG-3' HJ-plasmid-2 5'-TCA GAT AAT TGG CGA TTC TT-3'	148 bp
Controlo interno (CI)	CI-F 5'-GTGCTCACAC CAGTTGCCGC-3' CI-R 5'-GCTTGGCAGC TCGCATCTCG-3'	100 bp

A técnica de Multiplex PCR foi realizada num volume final de 25µl de mistura de reacção, consistindo em 2,5mM de MgCl₂ (Bioline, USA), tampão de reacção de PCR (10x) (Bioline, USA), 4µM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, GeHealthcare, UK), 0,25µM de cada um dos *primers* HJ-MOMP1/HJ-MOMP2 (TIB MOLBIOL, Quilaban) e HJ-plasmid1/HJ-plasmid2 (TIB MOLBIOL, Quilaban) e 0,1µM de cada *primer* CI-F/CI-R (TIB MOLBIOL, Quilaban), 0,04U de Taq (BioTaq DNA polimerase, Bioline, London, UK), 5µl de DNA da amostra clínica e água ultra pura para prefazer o volume total da mistura de reacção.

Em cada série de reacções de amplificação efectuadas utilizou-se um controlo positivo constituído por DNA de *C. trachomatis* serovar L2, extraído de uma cultura de

células McCoy, cedida pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (estirpe L2434B) e um controlo negativo de água ultra pura.

As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador T1 Thermocycler (Whatman, Biometra, Göttingen, Germany) com as seguintes condições de amplificação: 1º ciclo a 95°C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto e um ciclo final a 72°C durante 8 minutos.

Após a reacção de amplificação, os produtos amplificados foram separados por electroforese (Biorad, USA) em gel de agarose a 1,5% (Agarose multi-purpose, Bioline, UK), contendo 0,5µl/ml de brometo de etídeo (BioRad, USA) em tampão TBE 1X (0,89M Tris Borate, pH 8,3 + 20mM Na₂EDTA) (National Diagnostics, USA).

O tamanho dos fragmentos amplificados foi identificado pela utilização dos marcadores de peso molecular, HyperLadder II e HyperLadder V (Bioline, UK).

Para a electroforese utilizou-se 10µl de produto amplificado misturado com 3µl de tampão de amostra (solução saturada de sacarose com azul de bromofenol), tendo o gel sido submetido a um campo eléctrico de 100V e 50A durante 1 hora, em tampão TBE 0,5X numa tina de electroforese (EPS301, Amersham Pharmacia Biotech, USA).

A separação dos produtos de amplificação no gel foi visualizada por exposição do mesmo à luz ultravioleta do transluminador UV (BioRad, Italy) com o sistema fotográfico incorporado (Gel-Doc BioRad Software, Quantity One, version 4.5.0, BioRad).

A presença de infecção por *C. trachomatis* (resultado positivo) foi identificada pela visualização de uma banda de 148bp, resultante da amplificação de um fragmento do gene do plasmídeo críptico e de uma banda de 218bp, resultante da amplificação de um fragmento do gene *omp1*. A ausência de uma banda de 100bp, resultante da amplificação do controlo interno, foi interpretada como tendo existido inibição de amplificação.

2.3.1.3 Técnica de PCR em Tempo Real (Real Time-PCR)

A técnica de PCR em Tempo Real foi realizada no termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Robotics, Austrália), o qual é constituído por quatro canais de emissão de luz que permitem detectar várias sequências alvo numa mesma reacção de amplificação. Os produtos amplificados são identificados pela intensidade de fluorescência nos tubos de reacção, que é detectada nos respectivos canais.

A técnica utilizada baseou-se em Jalal *et al.* (2006), referido anteriormente. Uma vez que as sondas utilizadas por estes autores são de síntese exclusiva, foi pedido à casa comercial TIB MOLBIOL (Quilaban, Berlim) a síntese de novas sondas para serem utilizadas na técnica do presente estudo. Os *primers* e as sondas utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos *primers*, sondas e suas sequências, utilizadas na técnica de PCR em Tempo Real para a detecção de DNA de *C. trachomatis*.

<i>Primer ou Sonda</i>	<i>Sequência</i>	<i>Sonda</i>
HJ-MOMP-1	5'-GAC TTT GTT TTC GAC CGT GTT-3'	JOE
HJ-MOMP-2	5'-ACA RAA TAC ATC AAA RCG ATC CCA-3'	
Sonda MOMP	5'-ATG TTT ACV AAY GCY GCTT--BBQ	
HJ-plasmid-1	5'-AAC CAA GGT CGA TGT GAT AG-3'	ROX
HJ-plasmid-2	5'-TCA GAT AAT TGG CGA TTC TT-3'	
Sonda PL	5'- CGA ACT CAT CGG CGA TAA GG--BBQ	
CI-F	5'-GTG CTC ACA CCA GTT GCC GC-3'	Cy5
CI-R	5'-GCT TGG CAG C TC GCA TCT CG-3'	
Sonda CI	5' ATT GTG TGG GTG TGG TGT GGG TGT GTGC--BBQ	

A reacção de PCR foi realizada com um volume final de 25µl de mistura de reacção, consistindo em 0,125µM de cada *primer* HJ-MOMP-1/HJ-MOMP-2 (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim), 0,25 µM de cada *primer* HJ-Plasmid-1/HJ-Plasmid-2 (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim), 0,1µM de cada *primer* de CI-R/CI-F (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim), 0,1µM da sonda JOE-MOMP (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim), 0,2µM da sonda de ROX-PL (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim), 0,1µM da sonda Cy5-CI (TIB MOLBIOL, Quilaban, Berlim), 5U de Taq (FailSafe™ PCR System de Epicentre Biotechnologies, USA), 12,5µl de mistura de reacção

comercializadas PréMix Probe 3 (FailSafe™ PCR System de Epicentre Biotechnologies, USA), 5µl de DNA da amostra clínica e água ultra pura para prefazer o volume total da mistura de reacção.

Em cada série de reacções de amplificação efectuadas utilizou-se um controlo positivo igual ao utilizado na técnica de Multiplex PCR e três controlos negativos de água ultra pura.

A reacção de amplificação foi realizada no Rotor-Gene 3000, com um ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C.

A reacção de amplificação foi visualizada em tempo real no computador acoplado ao Rotor Gene 3000 e os resultados foram visualizados em três gráficos, correspondendo ao sinal de cada sonda (JOE, ROX e Cy5).

A partir dos controlos negativos obteve-se o limite (*threshold*) de um resultado negativo e do controlo positivo uma curva de amplificação (figura 7 e 8). Quando a curva da amplificação do controlo interno, adicionado a cada uma das amostras, foi equivalente à curva de amplificação do controlo negativo significou a existência de uma inibição na reacção de amplificação. Uma amostra clínica foi considerada positiva para pesquisa de *C. trachomatis*, quando existiu uma curva de amplificação superior ao limite (*threshold*) nos dois canais (JOE e ROX) (figura 7 e 8).

Uma amostra foi considerada negativa para pesquisa de *C. trachomatis* quando não houve sinal de amplificação nos canais JOE e ROX associado à curva de amplificação do controlo interno, no canal Cy5 (figura 7 e 8).

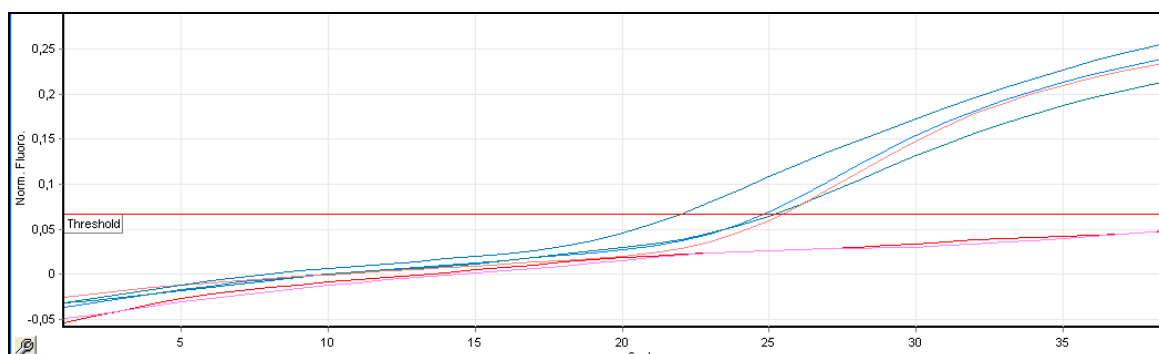


Figura 7. Curva correspondente ao sinal de fluorescência do canal JOE resultante da amplificação do fragmento do gene *omp1*.

Amostras positivas: azul claro, verde e salmão; Amostra negativa: rosa; Controlo positivo: azul escuro;
Controlo negativo: vermelho

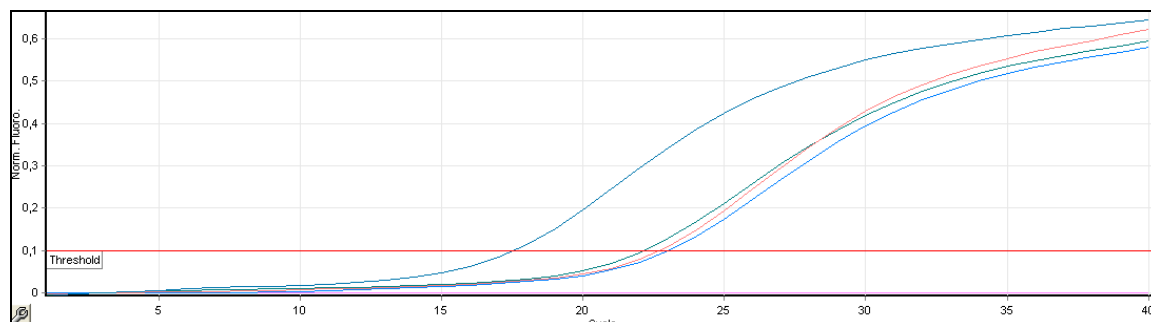


Figura 8. Curva correspondente ao sinal de fluorescência do canal ROX resultante da amplificação do fragmento do gene do plasmídeo críptico.

Amostras positivas: azul claro, verde e salmão; Amostra negativa: rosa; Controlo positivo: azul escuro; Controlo negativo: vermelho (o sinal de fluorescência é muito baixo não sendo visualizado na escala do gráfico).

2.3.2 Genotipagem

Todas as amostras em que foi detectada a presença de DNA de *C. trachomatis*, por qualquer uma das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos utilizadas, foram genotipadas.

Para tal, as amostras foram submetidas a uma técnica de Nested-PCR, adaptada de Yan *et al.* (1993), que consiste numa primeira amplificação de um fragmento do gene *omp1*, seguida de uma segunda amplificação de um fragmento interno ao primeiro, sendo por isso uma técnica com uma elevada sensibilidade e especificidade.

Para a 1ª amplificação (*outer-PCR*) utilizaram-se os *primers omp1* e *omp2* que amplificam um fragmento de 1142bp do gene *omp1* e para a 2ª amplificação (*inner-PCR*) utilizaram-se os *primers omp3* e *omp4* que amplificam um fragmento de 879bp dos produtos originados na 1ª amplificação (tabela 4).

Tabela 4. Descrição dos *primers* e do tamanho dos fragmentos amplificados utilizados na técnica de Nested-PCR.

Amplificação	Sequência dos <i>Primers</i>	Tamanho do fragmento amplificado
1ª amplificação	<i>Omp1</i> 5'- GCC GCT TTG AGT TCT GCT TCC TC -3' <i>Omp2</i> 5'- ATT TAC GTG AGC AGC TCT CTC AT - 3'	1142 bp
2ª amplificação	<i>Omp3</i> 5'-TGA CTT TGT TTT CGA CCG TGT TTT-3' <i>Omp4</i> 5'-TTT TCT AGA TTT CAT CTT GTT CAA YTG-3'	879 bp

A 1ª amplificação foi realizada com um volume final de 50µl de mistura de reacção consistindo em 1,5mM de MgCl₂ (Bioline, USA), tampão de reacção de PCR (10x) (Bioline, USA), 4µM de d’NTP (Amersham Pharmacia Biotech, Ge Healthcare, UK), 0,5µM de cada *primer omp1* e *omp2* (Invitrogen, USA), 0,25U de Taq (BioTaq DNA polimerase, Bioline, London, UK), 2,5µl de DNA da amostra clínica e água ultra pura para prefazer o volume total da mistura de reacção.

A amplificação foi realizada no termociclador *Master Cycle Personal* (Eppendorf, USA), com um 1º ciclo a 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos a 95°C durante 1 minuto e 30 segundos, 62°C durante 2 minutos e 30 segundos, 72°C durante 3 minutos e um ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

A 2ª amplificação foi realizada com um volume final de 50µl de mistura de reacção consistindo em 1,5mM de MgCl₂ (Bioline, USA), tampão de reacção de PCR (10x) (Bioline, USA), 4µM de d’NTP (Amersham Pharmacia Biotech, Ge Healthcare, UK), 0,5µM de cada *primer omp3* e *omp4*, 0,25U de Taq (BioTaq DNA polimerase, Bioline, London, UK), 1,5µl do produto da 1ª amplificação e água ultra pura para prefazer o volume total da mistura de reacção.

A amplificação foi realizada no termociclador *Master Cycle Personal* (Eppendorf, USA), com um 1º ciclo a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto e um ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

Em cada série de reacções de Nested-PCR efectuada no presente estudo, foram incluídos os controlos positivos e negativos, referidos anteriormente na técnica de Multiplex PCR.

Os produtos amplificados foram visualizados após electroforese (Biorad, Califórnia, USA) em gel de agarose a 1,5% (Agarose multi-purpose, Bioline, London, UK), contendo 0,5µl/ml de brometo de etídeo (BioRad, California, USA) em tampão TBE 1X (0,89M Tris Borate, pH 8,3 + 20mM Na₂EDTA) (National Diagnostics, USA).

O tamanho dos fragmentos amplificados foi identificado pela utilização dos marcadores de peso molecular, HyperLadder II e HyperLadder V (Bioline, UK).

A electroforese foi realizada pelo processo referido na técnica de Multiplex PCR (2.3.1.2).

Um resultado foi considerado positivo quando foi visualizado um fragmento de 879bp nos produtos da 2ª amplificação.

As amostras positivas pela técnica de Nested-PCR foram enviadas à empresa *STAB VIDA* (Oeiras, Portugal) para serem sequenciadas em ambas as direcções (directa e reversa).

As sequências complementares de cada amostra clínica obtidas após a sequenciação foram editadas e alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (version 7.0.9.0), sendo no final obtida uma sequência individual para cada amostra clínica.

A sequência individual foi analisada pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e comparada com sequências do gene *omp1* de genótipos conhecidos de *C. trachomatis* disponíveis no Genbank, identificando-se desta forma o genótipo presente na amostra.

2.3.3 Pesquisa e quantificação de anticorpos anti-*C. trachomatis*

Para a pesquisa e quantificação de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG e IgM no soro, efectuou-se uma técnica de imunofluorescência indirecta, utilizando-se o kit comercial *anti-Chlamydia trachomatis IIFT* (Euroimmun AG, Lübeck, Germany).

O kit é constituído por lâminas de reacção que possuem fixada uma monocamada de células infectadas com *C. trachomatis*. Na presença de anticorpos, quando um soro diluído é colocado em contacto com as células, os anticorpos específicos IgG ou IgM presentes no soro ligam-se aos antígenos das lâminas de reacção.

A reacção antígeno-anticorpo foi evidenciada pela utilização de uma imunoglobulina anti-humana anti-IgG ou anti-IgM, de acordo com o tipo de anticorpos a pesquisar, conjugada com isotiocianato de fluoresceína, que ao combinar com os anticorpos específicos de classe IgG ou IgM ligados ao antígeno *C. trachomatis* fixado, resulta numa reacção observável ao microscópio de fluorescência (figura 9).

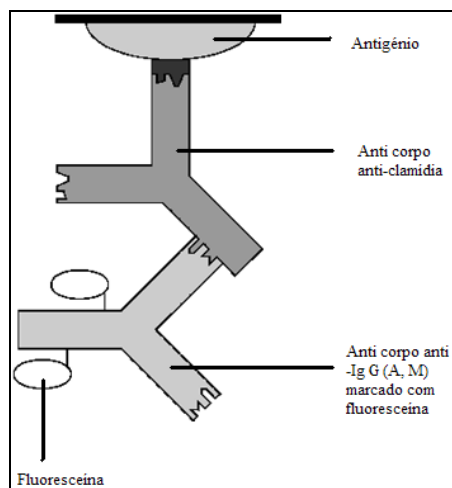


Figura 9. Esquema representativo da técnica de imunofluorescência indirecta.

Adaptado de www.euroimmun.de/immunflu.htm

Para os anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgG, a existência de reactividade entre a titulação de 1:320 e de 1:1.000 parece estar associada a uma infecção antiga ou a uma infecção aguda e quando a titulação destes anticorpos é igual ou superior a 1:1.000 parece estar associada a uma infecção aguda ou sistémica. Em relação aos anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgM, a reactividade na diluição de 1:10 é indicativa de uma infecção antiga ou de uma infecção aguda.

A quantificação de anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgG foi efectuada em todas as amostras de soro. Sempre que se verificou um título de 1:320, procedeu-se a diluições seriadas (1:1.000, 1:10.000) para titular os anticorpos IgG existentes na amostra clínica. Em todas as amostras em que se obteve um título de IgG igual ou superior a 1:1000, efectuou-se a pesquisa e titulação de anticorpos específicos da classe de IgM, com diluições seriadas (1:10, 1:100).

A pesquisa e a titulação de anticorpos foram efectuadas de acordo com o protocolo fornecido pela empresa comercial, o qual foi iniciado com a preparação dos reagentes, a que se seguiu a colocação das amostras à temperatura ambiente para se proceder à sua diluição.

Foram efectuadas diluições seriadas de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 da amostra de soro, em tampão fosfato salino pH 7,2 (PBS), adicionado de Tween 20 a 0,2%.

No suporte de reacção, colocou-se 25µl das seguintes soluções: diluições das amostras, controlo positivo (CP) e controlo negativo (CN) em contacto com o antígeno

fixado na lâmina, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após incubação e lavagem da lâmina aplicou-se 20µl do anticorpo anti-globulina humana marcado com fluoresceína (IgG ou IgM), incubando-se a lâmina durante 30 minutos em local escuro. Por fim, após uma segunda lavagem, as lâminas, cobertas com óleo de imersão e lamela, foram observadas ao microscópio de fluorescência (Dialux20, Leitz, USA) na objectiva de 40X.

Para a pesquisa de anticorpos da classe IgM foi necessário remover os anticorpos da classe IgG que pudessem existir na amostra, de forma a prevenir resultados de falsa reactividade, devido a uma possível reacção cruzada entre os anticorpos específicos de classe IgG e do factor reumatóide eventualmente presente de falsa negatividade, pela possibilidade dos anticorpos específicos de classe IgG competirem com os anticorpos específicos de classe IgM na ligação ao antigénio. Para isso, utilizou-se o reagente Eurosorb (Euroimmun AG, Lübeck, Germany) na proporção 1:10 com o soro, com o objectivo de precipitar os anticorpos da classe IgG. O soro e o reagente Eurosorb ficaram então em contacto durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugou-se (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Germany) a mistura a 2000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante obtido utilizado para a pesquisa e titulação dos anticorpos IgM.

O reagente Eurosorb consiste numa solução de anticorpos anti-humanos de cabra, com alta afinidade para os anticorpos de tipo IgG, eventualmente presentes na amostra, os quais precipitam após a reacção ter tido lugar.

Quando se observou fluorescência verde nos corpúsculos elementares das células fixadas na lâmina de reacção, a reacção foi considerada positiva (figura 10). Na ausência de fluorescência a reacção foi considerada negativa.

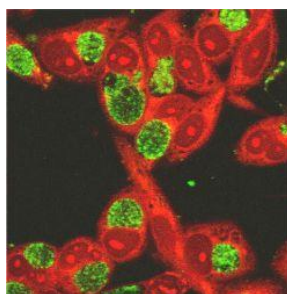


Figura 10. Exemplo de um resultado positivo na pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis*.

Fonte: Euroimmun AG, Lübeck, Germany

Embora um resultado do teste serológico seja considerado positivo quando o título dos anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG é igual ou superior a 1:320, em relação aos anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM, um resultado é considerado positivo quando o título desses anticorpos é igual ou superior a 1:10.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da população

No presente estudo participaram 516 indivíduos, dos quais 329 estudantes universitários, 39 homens que têm sexo com homens (HSH), 34 trabalhadoras do sexo, 40 indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) e 74 indivíduos que se deslocaram à Unidade Doenças Sexualmente Transmitidas (DST) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) para consulta de rastreio e aconselhamento de IST.

As amostras analisadas e a sua distribuição pelos vários grupos estudados estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Caracterização da população e das amostras analisadas pelos vários grupos estudados.

População	N.º Indivíduos	Género		Amostras Analisadas
		Masculino	Feminino	
Estudantes	329	76	247	Urina, Soro
HSH	39	39	-	Urina, Soro, Exsudado rectal
Trabalhadoras do sexo	34	-	34	Urina, Soro, Exsudado vaginal
HSM	40	11	29	Urina, Exsudado vaginal, uretral
IHMT	74	31	43	Urina, Soro, Exsudado vaginal, uretral, rectal, orofaríngeo, úlcera
Total	516	157	353	

HSH: homens que têm sexo com homens; HSM: indivíduos do Hospital de Santa Maria; IHMT: indivíduos da Unidade de DST do IHMT.

Do total de 516 indivíduos estudados, 68,4% eram do sexo feminino, 30,4% do sexo masculino e 1,2% (seis estudantes) não declararam o género.

Em relação à idade, foram apenas obtidos os dados de 455 indivíduos estudados, os quais tinham entre 17 e 64 anos de idade, com uma média da idade de 25 anos e moda de 22 anos (76 dos 455 indivíduos) (figura 11).

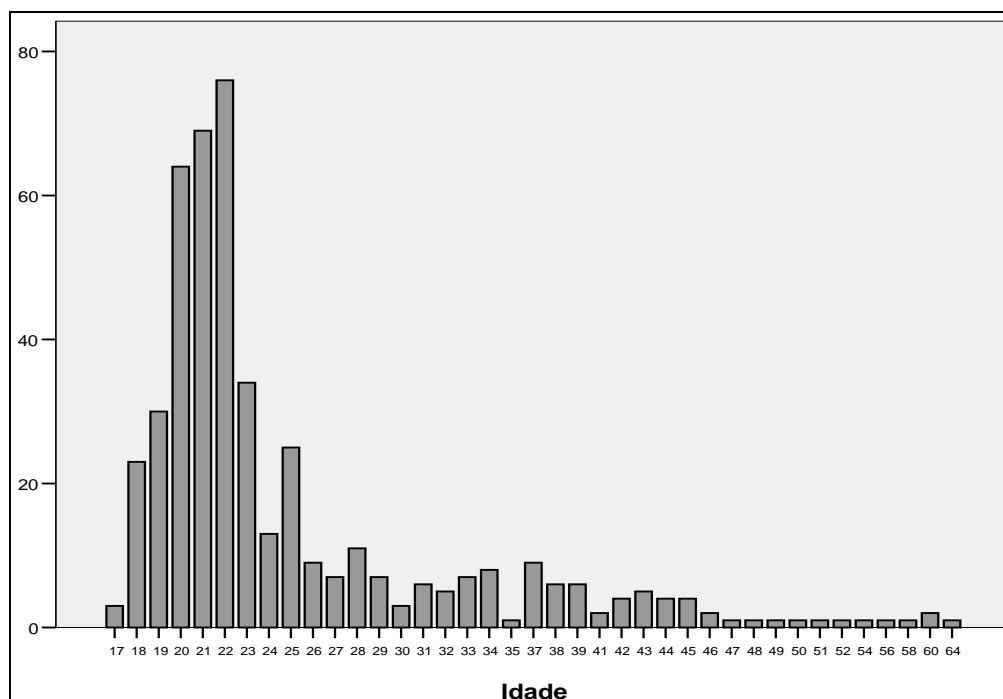


Figura 11. Idade dos indivíduos estudados.

Os estudantes universitários incluídos no estudo tinham entre os 17 e 46 anos de idade, os HSH entre os 19 e 60 anos de idade, as trabalhadoras do sexo entre os 19 e 56 anos de idade, os indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) entre os 17 e 46 anos de idade e os indivíduos da Unidade de DST do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) entre os 20 e 64 anos de idade.

Na totalidade foram analisadas 441 amostras de urina, 58 exsudados vaginais, três exsudados uretrais, sete exsudados rectais, dois exsudados da orofaringe, dois exsudados de úlcera e 315 amostras de soro (figura 12). Em 269 indivíduos foi efectuada colheita de amostras de urina e soro; em 151, 43 e 26 apenas amostras de urina, exsudado vaginal e soro, respectivamente; em onze indivíduos foi efectuada colheita de urina, exsudado vaginal e soro; em cinco urina, exsudado rectal e soro; em três urina e exsudado vaginal, em dois apenas exsudado uretral e em seis indivíduos colheram-se, respectivamente, exsudado rectal e orofaríngeo; exsudado de úlcera; exsudado uretral e soro; exsudado vaginal e soro; urina, exsudado rectal e orofaríngeo e urina, exsudado de úlcera e soro.

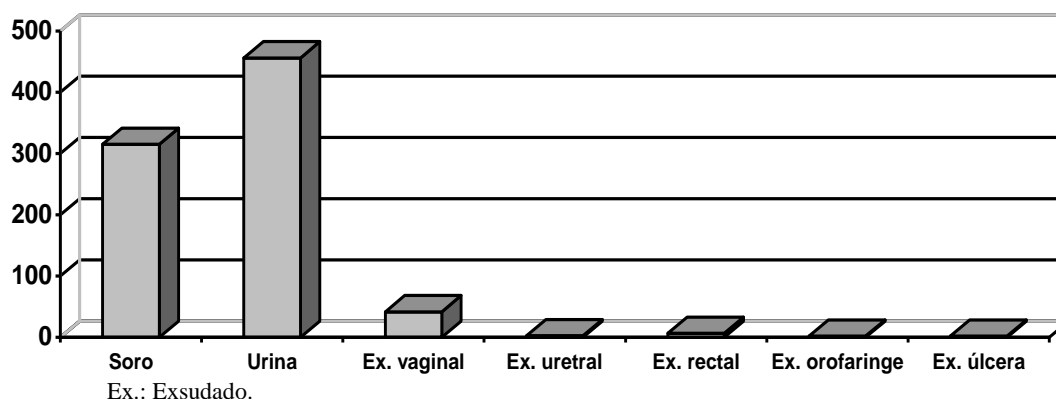


Figura 12. Amostras clínicas utilizadas nas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos.

O número e tipo de amostras recolhidas de cada grupo estudado são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Distribuição das amostras analisadas de acordo com os grupos estudados.

Amostras Analisadas	Estudantes	HSH	Trabalhadoras do sexo	IHMT	HSM	Total
Soro	250	6	34	25	-	315
Urina	310	39	31	37	24	441
Ex. vaginal	-	-	8	34	16	58
Ex. uretral	-	-	-	3	-	3
Ex. rectal	-	1	-	6	-	7
Ex. orofaringeo	-	-	-	2	-	2
Ex. úlcera	-	-	-	2	-	2
Total	560	46	73	109	40	

Ex.: Exsudado; HSH: homens que têm sexo com homens; IHMT: indivíduos da Unidade de DST do IHMT; HSM: indivíduos do Hospital de Santa Maria.

3.2 Identificação de *C. trachomatis* por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

Dos 516 indivíduos incluídos no estudo, 490 efectuaram colheita de amostras clínicas (urina ou exsudados) para identificação de *C. trachomatis* por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, sendo que para esse fim se utilizaram 513 amostras.

3.2.1 Técnica de Multiplex PCR

Dos 513 produtos clínicos estudados pela técnica de Multiplex PCR, a presença de *C. trachomatis* foi detectada em 12 (2,3%) amostras provenientes de 11 indivíduos, uma vez que se obtiveram duas amostras positivas (urina e exsudado vaginal) num mesmo indivíduo. Uma amostra (0,2%) demonstrou um resultado duvidoso (tabela 7), a qual era proveniente da Unidade de DST do IHMT de quem tinha sido colhida apenas uma amostra (urina).

Tabela 7. Resultados da técnica de Multiplex PCR.

Resultado	Número de amostras	%
Positivo	12	2,3
Negativo	500	97,5
Duvidoso	1	0,2

O resultado da amplificação pela técnica de Multiplex PCR está apresentado na figura 13.

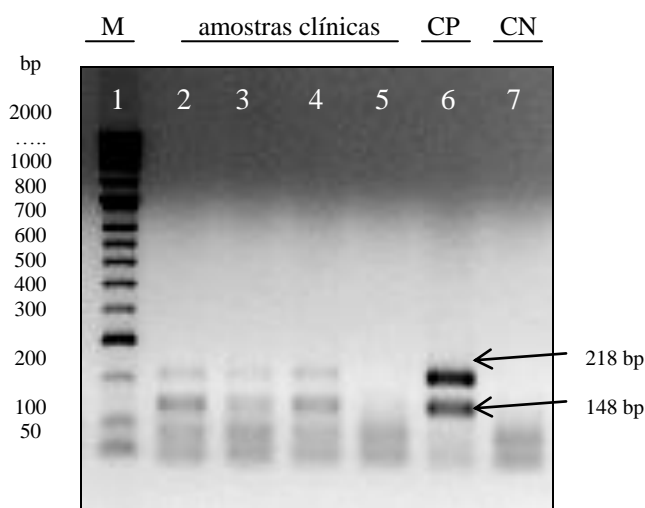


Figura 13. Produtos amplificados pela técnica de Multiplex PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%.

1 – marcador de pesos moleculares II; 2, 3 e 4 – amostras clínicas positivas;
5 – amostra clínica negativa; 6 – controlo positivo (CP) da reacção sem controlo interno;
7 – controlo negativo (CN) da reacção.

A amostra com resultado duvidoso apresentou apenas a banda de 148bp referente à amplificação do fragmento do gene do plasmídio críptico e a banda de 100bp referente à amplificação do controlo interno, como mostra a figura 14.

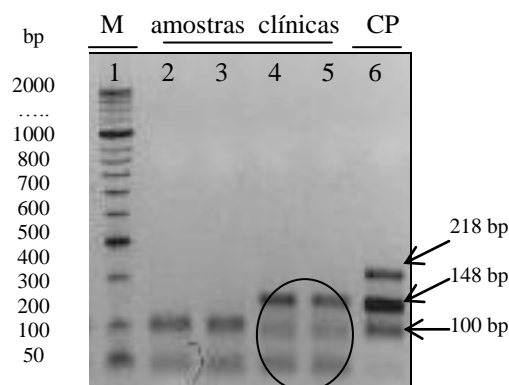


Figura 14. Produtos amplificados pela técnica de Multiplex PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%.

1 - marcador de pesos moleculares II; 2 e 3 - amostras clínicas negativas;
4 e 5 - amostra clínica positiva em duplicado; 6 - controlo positivo (CP) com controlo interno.

Para resolver o problema de uma possível inibição de amplificação do fragmento do gene *omp1* por excesso de DNA na reacção de PCR, a amostra foi novamente testada sem diluição e com diluições de 1:5 e 1:10, tendo sido obtidos os resultados da figura 15.

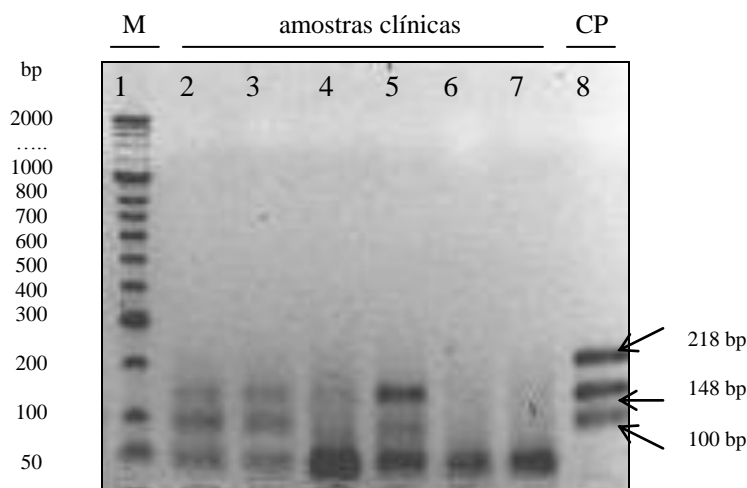


Figura 15. Resultado da amplificação da amostra com banda da amplificação do plasmídio críptico sem e com diluições sucessivas, pela técnica de Multiplex PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%.

1 - marcador de pesos moleculares II; 2 e 3 - amostra não diluída (duplicado); 4 e 5 - amostra diluída 1:5 (duplicado); 6 e 7 - amostra diluída 1:10 (duplicado); 8 - controlo positivo (CP) com controlo interno.

Após a electroforese observou-se o mesmo resultado na amplificação da amostra sem diluição e com a diluição de 1:5, enquanto que na diluição de 1:10, a banda de 148bp do plasmídeo críptico não foi observada. No entanto, a banda de 100bp do controlo interno foi observada em todas as diluições, concluindo-se que não ocorreu inibição da reacção de PCR.

3.2.2 Técnica de PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em Tempo Real identificou *C. trachomatis* em 17 (16%) amostras das 106 amostras analisadas por esta técnica (tabela 8).

Tabela 8. Resultados da técnica de PCR em Tempo Real.

Resultado	Número de amostras	%
Positivo	17	16
Negativo	89	84

3.2.3 Comparação dos resultados das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos utilizadas

Comparando os resultados obtidos nas 106 amostras estudadas por ambas as técnicas, verificou-se que 89 amostras apresentaram um resultado negativo e que 12 apresentaram um resultado positivo em ambas as técnicas.

Os resultados da comparação da pesquisa de *C. trachomatis* pela técnica Multiplex PCR e pela técnica PCR em Tempo Real estão sumarizados na tabela 9.

Tabela 9. Comparação de resultados das técnicas de Multiplex PCR e de PCR em Tempo Real.

Multiplex PCR	PCR em Tempo Real		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	12	0	12
Negativo	4	89	93
Duvidoso	1	0	1
Total	17	89	

Das 93 amostras com resultado negativo pela técnica de Multiplex PCR, quatro demonstraram um resultado positivo pela técnica de PCR em Tempo Real (tabela 9).

O mesmo foi verificado com a amostra com resultado duvidoso pela técnica de Multiplex PCR, que demonstrou um resultado positivo quando testada pela técnica de PCR em Tempo Real (tabela 9).

Assim, com a técnica de PCR em Tempo Real foi possível identificar mais cinco amostras com infecção por *C. trachomatis*, que demonstraram um resultado negativo ou duvidoso quando analisadas pela técnica de Multiplex PCR.

3.3 Genotipagem

As 17 amostras em que foi identificada *C. trachomatis* foram submetidas à técnica de Nested-PCR, para serem sequenciadas posteriormente e para identificação do genótipo.

A técnica de Nested-PCR identificou *C. trachomatis* em 16 das 17 amostras, testadas por esta técnica.

O resultado da amplificação de uma das amostras positivas pela técnica de Nested-PCR é apresentado na figura 16.

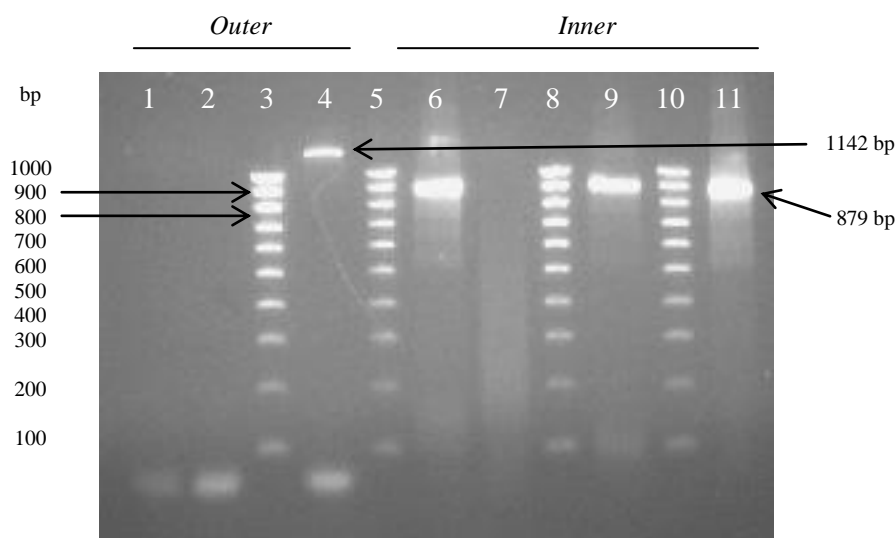


Figura 16. Resultado da amplificação pela técnica de Nested-PCR, após electroforese em gel de agarose a 1,5%.

3, 5, 8 e 10 – marcador de pesos moleculares IV; 1 e 2 – produtos amplificados na reacção *outer*; 4 – controlo positivo da reacção *outer*; 6 e 9 – produtos amplificados na reacção de *inner*; 7 – controlo negativo da reacção de *inner*; 11 – controlo positivo da reacção de *inner*.

Comparando a técnica de Nested-PCR com as outras duas técnicas utilizadas (tabela 10), a técnica de Multiplex PCR tinha apresentado um resultado positivo em 12 amostras, um resultado negativo em quatro e um resultado duvidoso em uma amostra das 16 anteriormente mencionadas, enquanto que a técnica de PCR em Tempo Real tinha apresentado 17 amostras com resultado positivo.

Pelos resultados obtidos na técnica de Nested-PCR, *C. trachomatis* foi identificada em 16 amostras de 15 indivíduos.

Tabela 10. Resultados das técnicas de Multiplex PCR, PCR em Tempo Real e Nested-PCR.

Identificação de <i>C. trachomatis</i> pelas NAATs utilizadas	Nested-PCR		Total
	Positivo	Negativo	
<u>Multiplex PCR</u>			
Positivo	12	0	12
Duvidoso	1	0	1
Negativo	3	1	4
Total	16	1	
<u>PCR em Tempo Real</u>			
Positivo	16	1	17
Total	16	1	

3.4 Prevalência de infecção por *C. trachomatis*

Neste estudo, *C. trachomatis* foi identificada em 15 indivíduos dos 516 analisados, os quais pertenciam aos indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) e da Unidade de DST do IHMT.

A prevalência na população da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) foi de 25% (10/40) e na população de indivíduos que recorreram à Unidade de DST do IHMT foi de 6,8% (5/74) (tabela 11), tendo sido apenas possível calcular a prevalência deste microrganismo nestes dois grupos.

Tabela 11. Prevalência da infecção por *C. trachomatis* (HSM e IHMT).

Resultados	HSM		IHMT		População estudada	
	Nº de indivíduos	%	Nº de indivíduos	%	Nº de indivíduos	%
Positivo	10	25	5	6,8	15	2,9
Negativo	30	75	69	93,2	501	97,1
Total	40	100	74	100	516	100

Nº: Número; HSM: Indivíduos do Hospital de Santa Maria; IHMT: Indivíduos da Unidade de DST do IHMT.

Analisando os 15 indivíduos com infecção por *C. trachomatis*, verificou-se que 5/15 (33,3%) destes eram do sexo masculino e 10/15 (66,7%) do sexo feminino, sendo que *C. trachomatis* foi identificada em duas amostras (urina e exsudado vaginal) de um mesmo indivíduo.

Dos 15 indivíduos com infecção por *C. trachomatis*, foi possível identificar a idade em seis, sendo que um tinha 21 anos de idade, dois 23 anos, um 27 anos, um 30 anos e um 32 anos.

C. trachomatis foi identificada em nove amostras de urina e em sete exsudados vaginais, sendo que, uma amostra de urina e um exsudado vaginal pertenciam ao mesmo indivíduo.

3.5 Genótipos de *C. trachomatis*

No presente estudo foram identificados 4 genótipos diferentes de *C. trachomatis*, D, Da, F e E.

Os genótipos mais prevalentes foram os genótipos D e F, respectivamente em 5/15 (33,3%) indivíduos para cada, seguindo-se o genótipo E em 4/15 (26,7%) indivíduos e em 1/15 (6,7%) indivíduos em que se detectou o genótipo Da (figura 17).

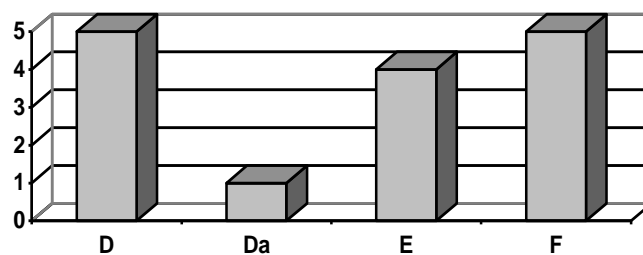


Figura 17. Genótipos identificados nos indivíduos do estudo.

Em relação ao tipo de amostras onde foram identificados os genótipos, o D foi identificado em três urinas e três exsudados vaginais, o Da num exsudado vaginal, o F em três urinas e dois exsudados vaginais e o E em três urinas e um exsudado vaginal.

No doente em que foi detectada a presença de *C. trachomatis* na urina e no exsudado vaginal, foi identificado o mesmo genótipo nas duas amostras analisadas (genótipo D).

Em relação ao género observamos que o genótipo D foi identificado em quatro indivíduos do sexo feminino e um do sexo masculino, o Da num indivíduo do sexo feminino, o E em dois indivíduos do sexo feminino e dois do sexo masculino e o F em três indivíduos do sexo feminino e dois do sexo masculino (tabela 12).

Tabela 12. Genótipos de *C. trachomatis* identificados por género dos indivíduos do estudo.

Genótipos	Género		Total
	Masculino	Feminino	
D	1	4	5
Da	0	1	1
E	2	2	4
F	2	3	5
Total	5	10	

3.6 Pesquisa e quantificação de anticorpos anti-*C. trachomatis*

Dos 516 indivíduos que participaram no estudo, foram testadas 315 amostras de soro, das quais 219 (69,5%) foram negativas, tendo sido detectada a presença de anticorpos anti-*C. trachomatis* em 96 (30,5%).

3.6.1 Prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG

Das 96 amostras com anticorpos anti-*C. trachomatis*, em 57 (59,4%) foi detectado um título de anticorpos da classe IgG de 1:320, em 38 (39,6%) um título de 1:1.000 e uma amostra (1,04%) apresentou um título de 1:10.000 (tabela 13).

Tabela 13. Prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG.

Título de anticorpos IgG	Indivíduos com anticorpos	%
1:320	57	18,1
1:1.000	38	12,1
1:10.000	1	0,3
Negativo	219	69,5
Total	315	100

A prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG foi mais elevada nas amostras provenientes dos indivíduos que recorreram à Unidade de DST do IHMT para rastreio e aconselhamento de IST dos quais 64% (16/25) apresentavam anticorpos, seguida das amostras provenientes das trabalhadoras do sexo, nas quais se detectaram anticorpos em 58,8% (20/34), das que foram colhidas em estudantes universitários com 23,6% (59/250) e por último as amostras provenientes dos homens que têm sexo com homens (HSH) com 16,7% (1/6) (tabela 14).

Tabela 14. Prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG nos vários grupos analisados.

Título de ac. IgG	Trab. do sexo		EST		HSH		IHMT		Total
	Indivíduos	%	Indivíduos	%	Indivíduos	%	Indivíduos	%	
1:320	9	26,5	42	16,8	0	0	6	24	57
1:1.000	11	32,4	17	6,8	1	16,7	9	36	38
1:10.000	0	0	0	0	0	0	1	4	1
Negativo	14	41,1	191	76,4	5	83,3	9	36	219
Prevalência de ac. IgG	20	58,8	59	23,6	1	16,7	16	64	
Total	34	100	250	100	6	100	25	100	

Ac.: anticorpos. Trab. do sexo: trabalhadoras do sexo; EST: estudantes universitários; HSH: Indivíduos do Hospital de Santa Maria; IHMT: Indivíduos da Unidade de DST do IHMT.

3.6.2 Prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM

Em todas as amostras com um título de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG igual ou superior a 1:1.000 (39 amostras) foram pesquisados anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM, das quais 14 (35,9%) apresentaram anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM com um título de 1:10 (tabela 15).

Tabela 15. Prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM.

Título de anticorpos IgM	Indivíduos com anticorpos	%
1:10	14	35,9
Negativo	25	64,1
Total	39	100

Em relação às 14 amostras que demonstraram possuir anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgM, sete foram provenientes de indivíduos que recorreram à Unidade de DST do IHMT para rastreio e aconselhamento de IST, seis de trabalhadoras do sexo e uma de estudantes universitários.

3.6.3 Presença de anticorpos anti-*C. trachomatis*, gênero e idade

Só foi possível obter informação sobre gênero em 94 indivíduos com presença de anticorpos anti-*C. trachomatis*, sendo que 67 eram do gênero feminino e 27 do gênero masculino.

Dos 67 indivíduos do sexo feminino, 41 amostras apresentaram um título de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG de 1:320, 26 um título de 1:1.000 e nove um título de 1:1.000 e um título de anticorpos da classe IgM de 1:10 (tabela 16).

Dos 27 indivíduos do sexo masculino, 16 amostras apresentaram um título de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG de 1:320, seis um título de 1:1.000, quatro um título de 1:1.000 e um título de anticorpos da classe IgM de 1:10 e uma amostra um título de anticorpos IgG de 1:10.000 e um título de anticorpos da classe IgM de 1:10 (tabela 16).

Tabela 16. Título de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG e IgM e o género dos indivíduos.

Título de anticorpos anti- <i>C. trachomatis</i>	Género	
	Masculino	Feminino
IgG 1:320	16	41
IgG 1:1.000	6	26
IgG 1:1.000 IgM 1:10	4	0
IgG 1:10.000	0	0
IgG 1:10.00 IgM 1:10	1	9
Negativo	53	163

As amostras com anticorpos anti-*C. trachomatis* eram provenientes de indivíduos com idade entre os 19 e os 60 anos, com maior prevalência em indivíduos com 20 anos [14,1% (64/455)], 21 anos [15,2% (69/455)] e 22 anos [16,7% (76/455)].

3.6.4 Presença de anticorpos anti-*C. trachomatis* e presença de DNA de *C. trachomatis*

Oitenta e seis dos indivíduos incluídos no estudo efectuaram colheita de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis* e também colheita de outras amostras para identificação de DNA de *C. trachomatis*, sendo que em apenas dois se identificou DNA de *C. trachomatis* com presença de anticorpos anti-*C. trachomatis*. O seu título de anticorpos da classe IgG era de 1:1.000 e 1:10 para anticorpos da classe IgM e de 1:10.000 para os da classe IgG e 1:10 para os da classe IgM, respectivamente (tabela 17).

Por outro lado, dos 84 indivíduos nos quais *C. trachomatis* não foi identificada, em 51 foi detectado um título de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG de 1:320, em 22 de 1:1.000 e em 11 de 1:1.000 e um título de anticorpos IgM de 1:10 (tabela 17).

Tabela 17. Presença de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG e IgM e identificação de DNA de *C. trachomatis*.

Presença de anticorpos	Presença de DNA		Total
	Positivo	Negativo	
IgG 1:320	0	51	51
IgG 1:1.000	0	22	22
IgG 1:1.000 IgM 1:10	1	11	12
IgG 1:10.000 IgM 1:10	1	0	1
Total	2	84	86

4. DISCUSSÃO

A infecção urogenital por *C. trachomatis* é reconhecida como uma das infecções sexualmente transmitidas (IST) mais prevalentes, ultrapassando com frequência os números de casos de outras IST (24, 83, 92, 112, 134).

Na maioria dos casos, o carácter assintomático desta infecção, tanto em homens como em mulheres, constitui a base para a formação de reservatórios, que perpetuam a transmissão e a aquisição da mesma. Quando não tratada, poderá ascender ao tracto genital superior originando, nas mulheres, doença inflamatória pélvica, que por sua vez pode originar infertilidade e gravidez ectópica e nos homens epididimite, que poderá também levar à infertilidade (7, 10, 15, 18, 26, 46, 56, 71, 76, 79, 88, 89, 92, 101, 107, 112, 127).

A detecção precoce e o tratamento destas infecções assintomáticas através de programas de rastreio é o núcleo central no combate a este importante problema de saúde pública (10, 20, 71, 90, 127).

Por ser um microrganismo de crescimento intracelular e os testes convencionais de diagnóstico (cultura, DFA e EIA) apresentarem elevado custo e/ou baixa sensibilidade de detecção, nomeadamente se a amostra não for apropriada, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) são, hoje em dia, recomendadas para o diagnóstico de infecções por *C. trachomatis*.

Os testes NAATs, têm sido sugeridos para programas de rastreio deste microrganismo não só, pela sua elevada sensibilidade e especificidade, mas também porque se podem utilizar amostras não invasivas, como urina ou exsudado vaginal, favorecendo a adesão dos participantes assintomáticos ao rastreio. No entanto, apresentam ainda um custo final elevado, permanecendo inacessíveis a muitos laboratórios.

No presente estudo foi efectuada a pesquisa de *C. trachomatis* em diversas populações indiciadas como sendo de elevado risco para contrair infecção por este microrganismo, para se conhecer a sua prevalência e caracterizar os seus genótipos. Ao mesmo tempo, pretendeu-se avaliar a utilidade de alguns testes (NAATs e serologia) no diagnóstico desta IST.

4.1 População

As populações escolhidas foram estudantes com idade geralmente referenciada (7, 23, 83, 84) como de elevada prevalência de infecção por *C. trachomatis*, de tal modo que o rastreio deste microrganismo se recomenda nas mulheres entre os 19 e os 25 anos de idade; trabalhadoras do sexo pelos múltiplos parceiros sexuais que apresentam (36, 81, 119); homens que têm sexo com homens (HSH) porque a proctite causada pelo serótipo L2b de *C. trachomatis*, a nova forma de LGV, aparece essencialmente neste grupo (58, 124) e o aumento do número de casos de sífilis em vários países da Europa e nos Estados Unidos é mais notória nos HSH, o que se deve provavelmente à existência de comportamentos de risco neste grupo populacional (12, 22, 24, 58, 68, 85, 116, 122, 124, 128).

Os indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) e os indivíduos que se deslocaram à Unidade de DST do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) para rastreio e aconselhamento de IST foram analisados por serem suspeitos de infecção sexualmente transmitida e como tal serem também considerados como tendo tido comportamentos de risco recentes.

A média da idade dos 516 indivíduos que participaram no estudo foi de 25 anos, sendo que a sua maioria (76 em 455 dos indivíduos com a idade identificada) tinha 22 anos, correspondendo esta à idade mais frequente apresentada em vários estudos do género realizados na Europa e Estados Unidos (7, 23, 77, 83, 84, 137). No entanto, e tanto quanto é do nosso conhecimento, no único estudo deste género realizado em Lisboa, a média de idades foi de 23 anos (13).

A maioria dos indivíduos incluídos (68,4%) era do sexo feminino, o que está também de acordo com outros estudos efectuados (7, 13, 23, 24, 61, 71, 83, 137), embora a sua maioria só tenham incluído mulheres (13, 61, 83, 137).

4.2 Identificação de *C. trachomatis* por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

Das 513 amostras testadas pela técnica de Multiplex PCR, apenas 106 amostras foram testadas pela técnica de PCR em Tempo Real, tendo sido detectada a presença de DNA de *C. trachomatis* em 17 amostras de 16 indivíduos.

Analizando os resultados obtidos com as técnicas de Multiplex PCR e de PCR em Tempo Real, verificou-se que a segunda técnica apresentou melhores resultados, tendo-se detectado a infecção em 16% (17/106) das amostras, em relação a 11,3% (12/106), resultado que se obteve quando se utilizou a técnica de Multiplex PCR.

As 12 amostras nas quais foi identificada *C. trachomatis* pela técnica de Multiplex PCR mantiveram o mesmo resultado quando analisadas pela técnica de PCR em Tempo Real mas, uma amostra com resultado duvidoso pela técnica de Multiplex PCR revelou um resultado positivo, quando analisada pela técnica de PCR em Tempo Real. No entanto, foi detectado DNA de *C. trachomatis* em quatro amostras com resultado negativo pela técnica de Multiplex PCR, quando estas foram analisadas pela técnica de PCR em Tempo Real.

Quando se utilizou a técnica de Nested-PCR para a genotipagem, *C. trachomatis* só foi identificada em 16 das 17 amostras em que tinha sido detectada pela técnica de PCR em Tempo Real.

Este resultado falso-positivo da técnica de PCR em Tempo Real poderá estar relacionado com uma possível contaminação da amostra durante o processamento da mistura de reacção, aquando a colocação do DNA.

Na amostra com resultado duvidoso pela técnica de Multiplex PCR, tinha sido observada apenas a banda de 148bp referente à amplificação do fragmento do gene do plasmídeo críptico, contrariamente às restantes amostras com resultado positivo, em que tinham sido observadas duas bandas, uma de 218bp referente à amplificação do fragmento do gene de *omp1* e uma de 148bp referente à amplificação do fragmento do gene do plasmídeo críptico.

Como em cada corpúsculo de *C. trachomatis* existem cerca de 7 a 10 cópias do gene do plasmídeo críptico e uma cópia do gene *omp1* (10, 34, 112), a amostra com resultado duvidoso, foi testada novamente pela técnica de Multiplex PCR, após várias

diluições, para verificar se tinha ocorrido inibição da amplificação do gene *omp1* devido a excesso de cópias do gene do plasmídeo críptico na amostra.

Quando se efectuaram estas diluições, na diluição de 1:5 os resultados obtidos foram idênticos aos resultados iniciais sem diluição e na diluição de 1:10 deixou de se observar também a banda de 148bp (banda do fragmento do gene do plasmídeo críptico) e como a banda de 100bp do controlo interno foi observada em todas as diluições, concluiu-se que não ocorreu inibição da reacção de PCR e que não deveria haver na amostra, excesso de cópias do gene do plasmídeo críptico.

C. trachomatis foi, no entanto, detectada quando esta mesma amostra foi analisada pela técnica de PCR em Tempo Real e Nested-PCR, tendo sido também identificado o seu genótipo.

Os resultados obtidos nas quatro amostras em que *C. trachomatis* foi identificada pela técnica de PCR em Tempo Real e não na técnica de Multiplex PCR, poderão estar relacionados com a pouca quantidade de DNA existente na amostra, uma vez que esta técnica parece ser mais sensível do que a técnica Multiplex PCR (4, 51).

Assim, a técnica de PCR em Tempo Real detectou mais casos de infecção do que a técnica de Multiplex PCR na pesquisa de DNA de *C. trachomatis*. Além disso, parece excluir ainda resultados duvidosos. No entanto, a sua capacidade de diferenciação em relação a resultados duvidosos precisa de ser confirmada em outros estudos, uma vez que apenas se obteve uma amostra duvidosa com a técnica de Multiplex PCR.

Como já referido na introdução, a técnica de PCR em Tempo Real tem-se mostrado como uma metodologia rápida, com elevada sensibilidade e especificidade (50, 51) no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* (10, 26, 27, 38, 43, 49, 50, 51, 73), visto ser uma tecnologia baseada na contínua detecção dos produtos amplificados à medida que estes são formados, dentro dos tubos, sem necessidade de os abrir, evitando contaminação com DNA exógeno (resultados falso-positivos) e reduzindo o tempo de execução. Além disso, como utiliza sondas de hibridação fluorescentes torna-se mais sensível e específica (4, 50, 51, 88).

Considerando os resultados obtidos, a utilização da tecnologia de PCR em Tempo Real para o diagnóstico de infecções urogenitais por *C. trachomatis*, parece ser a técnica a utilizar para o diagnóstico desta infecção nos laboratórios de patologia clínica,

pelas suas vantagens em relação às outras técnicas de PCR ainda hoje utilizadas na maioria desses laboratórios.

4.3 Prevalência de infecção por *C. trachomatis*

Neste estudo, *C. trachomatis* foi identificada em 16 amostras de 15 indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria e da Unidade de DST do IHMT para consulta de rastreio e aconselhamento de IST, pelo que a prevalência de infecção por *C. trachomatis* foi de 25% (10/40) nos indivíduos da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) e de 6,8% (5/74) nos indivíduos que se deslocaram à Unidade de DST do IHMT.

Esta prevalência está de acordo com alguns estudos efectuados em hospitais e clínicas com consulta de venereologia, IST e planeamento familiar (61, 77, 84, 137). Também o CDC refere que as taxas de prevalência da infecção por *C. trachomatis* variam de 5% a 20% entre mulheres atendidas em clínicas de planeamento familiar e de 20% a 40% em adolescentes do sexo feminino sexualmente activas que frequentam clínicas de IST (10, 18, 45). Nos homens, a prevalência de infecção deste microrganismo varia entre 4 a 10% em casos assintomáticos e 15 a 20% em casos sintomáticos (45, 56).

Tendo em conta os resultados obtidos nos indivíduos com infecção por *C. trachomatis*, não foram verificadas diferenças nos resultados das amostras de urina e de exsudados vaginais, tendo-se obtido nove amostras de urina e sete exsudados vaginais com DNA de *C. trachomatis*, dos quais uma amostra de urina e um exsudado vaginal pertencem ao mesmo indivíduo.

No entanto, em nenhuma das amostras clínicas dos estudantes universitários, dos homens que têm sexo com homens (HSH) e das trabalhadoras do sexo foi detectada infecção por *C. trachomatis*, o que não se esperava uma vez que, tal como anteriormente referido, esta população deve ter uma elevada prevalência de IST (7, 12, 22, 24, 36, 58, 81, 83, 116, 119, 122, 124, 128).

Em relação aos estudantes universitários, a ausência de indivíduos infectados pode ter sido devido ao local de realização do rastreio, podendo não ter sido o mais adequado, uma vez que foi realizado nas instalações comuns das universidades. Os

indivíduos com maior risco de IST, talvez com receio de falta de privacidade, podem não se ter voluntariado para o rastreio.

Tal como nos estudantes, nos HSH pode ter acontecido que, por receio de terem resultados positivos e uma vez que o rastreio era voluntário, preferissem não se oferecer para serem testados, quando sabiam que tinham um risco elevado de terem uma IST. Além do que, os indivíduos que comparecem ao rastreio dessa infecção podem não adoptar tantos comportamentos de risco como os que não se oferecem para tal.

Outra das razões para não terem sido identificados indivíduos com esta infecção, será o local da realização do rastreio (bares e saunas *gay*), que por norma é um local de diversão, sendo que muitos indivíduos não querem sequer pensar na possibilidade de estarem infectados quando se estão a divertir. Por isso, o número de amostras colhido foi relativamente reduzido, tendo em conta o tempo de duração do rastreio. Também o facto da urina estar demasiado diluída, pela quantidade de bebidas alcoólicas ingeridas em alguns casos e não ter sido colhida pelo menos uma hora depois da última micção, poderá resultar na ausência de casos de infecção.

No grupo de trabalhadoras do sexo, a ausência de infecção por *C. trachomatis* torna-se difícil de explicar, uma vez que este grupo tem, por norma uma elevada prevalência de IST (22, 38, 81, 83, 84, 119). Num estudo realizado no Senegal em 2000 (119) foi detectada uma prevalência de 28,5% (206/722) em trabalhadoras de sexo, embora esta prevalência seja diferente nos países europeus, sendo cerca de 14% (74).

Esta situação é ainda menos justificável, uma vez que tendo este trabalho continuado foram analisadas mais 42 trabalhadoras de sexo, desde Abril de 2009 até Junho de 2010, num total de 76 mulheres rastreadas e das quais em apenas uma mulher foi identificada *C. trachomatis*.

Os resultados obtidos no presente estudo, referidos anteriormente, poderão estar relacionados com a possibilidade destas, efectuarem lavagens vaginais excessivas com anti-sépticos, o que é referido por todas, que poderão eventualmente eliminar *C. trachomatis* e que justifica também o facto da flora de Doderlein estar ausente na maioria das mulheres estudadas.

A prevalência de infecção urogenital por *C. trachomatis* em Portugal, assim como de outras IST, ainda não está bem documentada, porque que os estudos epidemiológicos efectuados até hoje são escassos. No único estudo conhecido do género

(13) realizado em Portugal, obteve-se uma prevalência de 4,6%, mas a amostra era apenas constituída por mulheres da área de Lisboa, com idade entre os 14 e os 30 anos de uma consulta do planeamento familiar.

Dos 15 indivíduos com infecção por *C. trachomatis*, foi possível identificar a idade em seis, variando esta de 21 a 32 anos de idade, sendo esta idade referenciada como de elevada prevalência de infecção por *C. trachomatis* (7, 23, 83, 84).

4.4 Genótipos de *C. trachomatis*

Nas 16 amostras que foram positivas e genotipadas e que eram provenientes de 15 indivíduos, foram identificados quatro genótipos de *C. trachomatis* diferentes (D, Da, F e E).

Os genótipos mais prevalentes foram o D e o F, provenientes de cinco indivíduos cada um, seguindo-se o genótipo E de quatro indivíduos e o genótipo Da de um indivíduo.

Para alguns autores, o genótipo E é o mais prevalente, seguido do F ou G e posteriormente o genótipo D (11, 30, 40, 64, 70, 115, 119).

Dos genótipos identificados, o mais prevalente no sexo feminino foi o genótipo F (4/10) e no sexo masculino foi o genótipo E e F com dois indivíduos cada um (2/5).

Um estudo realizado por Borrego *et al.* (11) em Lisboa identificou o genótipo E como o mais prevalente em indivíduos tanto do sexo masculino (34/71, 47,9%) como do sexo feminino (74/169, 43,8%). Os genótipos D e F foram os segundos mais prevalentes nos indivíduos do sexo masculino (8/71, 11,3%) e o genótipo H é o segundo mais prevalente em indivíduos do sexo feminino (33/169, 19,5%). Os genótipos F, G e D e os genótipos H, G e I foram os menos prevalentes no sexo feminino e masculino, respectivamente.

Noutro estudo realizado por Gomes *et al* (42) em Lisboa em consultas de planeamento familiar e de medicina geral e familiar, o serótipo E foi identificado como o mais prevalente, seguido do serótipo F. O serótipo G foi o terceiro mais prevalente, seguido do serótipo D ou Da, que é normalmente o terceiro serótipo mais prevalente.

Os resultados obtidos no presente estudo são concordantes, na generalidade com os genótipos mais prevalentes identificados nos estudos referenciados. No entanto, o

número de genótipos identificados no estudo foi pequeno para uma análise mais significativa e para os associar a diferentes tipos de sintomatologia.

4.5 Prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis*

Como referido nos resultados (3.6), foram detectados anticorpos anti-*C. trachomatis* em 30,5% (96/315) das amostras analisadas.

A maioria dos indivíduos analisados apresentava anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgG, numa titulação igual ou superior a 1:320 (59,4% dos indivíduos), o que revela que possivelmente 59,4% destes indivíduos já tiveram infecção por *C. trachomatis*. Estudos anteriores apresentam resultados semelhantes, variando a prevalência destes anticorpos entre 57,4% e 66,6% em indivíduos atendidos em consultas de planeamento familiar (9, 81, 82, 98), se bem que a prevalência encontrada em dadores de sangue foi de 27,7% (9).

No presente estudo, a prevalência mais elevada de anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgG verificou-se nas amostras provenientes de indivíduos da Unidade de DST do IHMT, dos quais 64% (16/25) apresentavam anticorpos, sendo que 24% (6/25) apresentavam uma titulação de anticorpos IgG entre 1:320 e 1:1.000, 36% (9/25) apresentavam títulos entre 1:1.000 e 1:10.000 e 4% (1/25) apresentavam uma titulação de anticorpos IgG igual ou superior a 1:10.000, referida anteriormente como estando associada a infecção aguda ou sistémica.

Os resultados obtidos nos indivíduos da Unidade de DST do IHMT reforçam o facto anteriormente referido, de que estes recorrem a esta consulta por suspeita de algum tipo de IST porque possivelmente não utilizaram preservativo e tiveram algum tipo de contacto sexual suspeito, tendo possivelmente tido contacto anterior com *C. trachomatis* sendo que, em sete indivíduos existe forte suspeita de infecção aguda, uma vez que, têm anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM com um título de 1:10.

Vários estudos têm demonstrado que titulações elevadas destes anticorpos estão associadas a infecção do aparelho genital superior feminino como doença inflamatória pélvica e salpingite, referindo ainda que nestes casos, os testes de detecção do microrganismo são muitas vezes ineficazes, devendo a serologia ser valorizada (28, 35, 126).

Outros estudos sugerem ainda que títulos elevados de anticorpos podem estar relacionados com infecções por LGV, que sendo uma doença sistêmica induz uma resposta imunitária mais forte do que no caso de uma infecção urogenital (35, 126).

Neste estudo, também se verificou uma prevalência elevada de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG nas amostras provenientes das trabalhadoras do sexo (58,8%), das quais 26,5% (9/34) apresentavam uma titulação de anticorpos IgG entre 1:320 e 1:1.000 e 32,4% (11/34) apresentava uma titulação de anticorpos IgG entre 1:1.000 e 1:10.000.

Estes resultados parecem indicar que as trabalhadoras de sexo estão bastante vulneráveis à infecção e embora não se tenha detectado nenhum caso de infecção aguda por *C. trachomatis*, pode reforçar a teoria anteriormente formulada da utilização constante de antisépticos locais e quem sabe de antibióticos orais.

A população em que também seria de esperar encontrar um grande número de amostras com anticorpos anti-*C. trachomatis* seria a dos homens que têm sexo com homens, pelos seus comportamentos de risco, descritos num grande número de artigos (83, 84, 128) e pela sua prevalência elevada também referida em publicações de vários autores (7, 12, 22, 23, 83, 84, 85, 116, 124, 125, 128).

No entanto, neste estudo, apenas em seis indivíduos desta população foi efectuada a pesquisa de anticorpos, dos quais apenas num indivíduo foi identificada a presença de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG com um título de 1:1.000 para anticorpos da classe IgG.

O grupo dos estudantes e tal como seria de esperar, foi aquele em que se identificou menor prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* (23,6%, 59/250), dos quais 16,8% (42/250) apresentavam um título entre 1:320 e 1:1.000 e 6,8% (17/250) um título entre 1:1.000 a 1:10.000, sendo que a prevalência de anticorpos da classe IgG neste grupo foi de 23,6%. Estes resultados são concordantes com um artigo da especialidade que analisa este tipo de população (123), onde se verifica uma prevalência de título de anticorpos anti-*C. trachomatis* de 38,4% em adolescentes com menos de 20 anos e 24,2% em adolescentes com mais de 20 anos.

Os anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgM foram detectados em 35,9% (14/39) das amostras analisadas para a pesquisa de anticorpos da classe IgM, apesar desta prevalência não ser concordante com outro estudo da especialidade (82), em que

se obteve uma prevalência de 2,6% (182/7.002) em indivíduos de ambos os sexos que recorreram a clínicas de planeamento familiar. No entanto, deve-se ter em conta que o número de amostras analisados para a pesquisa de anticorpos da classe IgM foi muito mais elevada do que no presente estudo (7.002 vs 39).

Os anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgM foram apenas detectados nos indivíduos com um título de anticorpos de classe IgG igual ou superior a 1:1.000, associada a possível presença de infecção aguda ou sistémica, segundo o fabricante do teste utilizado, contrariamente ao estudo referido anteriormente (82), onde todas as 7.002 amostras foram submetidas à pesquisa de anticorpos da classe IgG e IgM.

4.6 Relação entre a prevalência de anticorpos anti-*C. trachomatis* e a prevalência de *C. trachomatis*

Dos 86 indivíduos incluídos no estudo que efectuaram colheita de soro para pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis* e de outras amostras para identificação de DNA de *C. trachomatis*, este microrganismo foi identificado apenas em dois indivíduos onde o título de anticorpos da classe IgG era de 1:1.000 e 1:10 para anticorpos da classe IgM e de 1:10.000 para anticorpos da classe IgG e 1:10 para anticorpos da classe IgM, respectivamente.

Pelo contrário, dos 84 indivíduos em que *C. trachomatis* não foi identificada, em 51 foi detectado um título de anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgG de 1:320, em 22 um título de 1:1.000 e em 11 um título de anticorpos IgG de 1:1.000 e simultaneamente um título de anticorpos IgM de 1:10.

Estes resultados sugerem que a população em geral apresenta anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgG, sem ter uma infecção activa, parecendo confirmar que os anticorpos de classe IgG estão presentes por um longo período de tempo após contacto com o microrganismo.

Dos 14 indivíduos com anticorpos anti-*C. trachomatis* da classe IgM com um título de 1:10, relacionados com uma infecção aguda, apenas em dois foi verificada a presença de *C. trachomatis*, sendo que em dois dos restantes 11 indivíduos com anticorpos foram analisadas amostras de urina e de exsudado vaginal pela técnica de Multiplex PCR e PCR em Tempo Real.

Os resultados do presente estudo indicam, tal como outros (81, 82) que o método serológico não é um bom método para diagnóstico de infecção urogenital por *C. trachomatis*, mas poderá ser útil em estudos epidemiológicos, podendo indicar a presença anterior de infecção por *C. trachomatis*, tendo em conta, os presentes resultados, em que 96 indivíduos do total de 315 indivíduos (30,4%) que colheram amostra de soro já tinham tido contacto com este microrganismo.

Um aspecto a ter em atenção, é a possibilidade de reacções cruzadas com outras espécies de *Chlamydia* na pesquisa de anticorpos anti-*C. trachomatis*, podendo algumas titulações não corresponder a infecções urogenitais, embora em pequeno número, como referem alguns autores (10, 20, 134). Num estudo realizado em indivíduos da consulta de planeamento familiar, a reacção cruzada de *C. trachomatis* com *C. pneumoniae* e *C. psittaci* foi de 32,6% para anticorpos da classe IgG e 2,5% para IgM, tendo sido analisadas 7.002 amostras (82).

4.7 Necessidade de execução do rastreio de infecção por *C. trachomatis*

Tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo pode concluir-se que o rastreio de infecção urogenital por *C. trachomatis* poderá ter algum impacto em estudantes universitários, trabalhadoras do sexo e homens que têm sexo com homens (HSH), uma vez que nestas populações, apesar de não ter sido detectada nenhuma amostra com DNA de *C. trachomatis*, existe uma prevalência elevada de anticorpos anti-*C. trachomatis* com título >1.000 (6,8%, 32,4% e 16,7%, respectivamente), indicando possivelmente, um contacto prévio com este microrganismo.

Tendo em conta os resultados obtidos nos indivíduos das consultas do Hospital de Santa Maria e da Unidade de DST do IHMT, a pesquisa de *C. trachomatis* deverá ser sempre efectuada nos indivíduos que ocorrem a essa consulta à semelhança do que se faz com a sífilis, HIV e vírus da hepatite B.

É importante ter em conta que nesta infecção a maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos, resultando num grande número de reservatórios desconhecidos infectados, capazes de transmitir a infecção aos seus contactos sexuais. Uma boa estratégia para combater esses reservatórios será a implementação de rastreios

de IST, principalmente nas populações que tenham comportamentos de risco e elevado risco de contrair a infecção, como parecem ser as deste estudo.

Deve ter-se em conta que a prevenção da infecção urogenital por *C. trachomatis* é sempre de maior custo-eficácia do que o tratamento da doença efectiva, tendo em conta as sequelas físicas e emocionais que podem resultar da infecção por este microrganismo.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A realização deste estudo permitiu conhecer a prevalência de infecção por *C. trachomatis* e de anticorpos anti-*C. trachomatis* numa população de estudantes universitários, de homens que têm sexo com homens (HSH) e de trabalhadoras do sexo que efectuaram rastreio deste microrganismo e ainda de duas consultas de IST, uma do Hospital de Santa Maria e outra da Unidade de DST do IHMT, na área da grande Lisboa.

C. trachomatis foi apenas identificada na população que procurou os cuidados clínicos, com uma prevalência de 25% nos indivíduos da consulta do Hospital de Santa Maria e de 6,8% nos indivíduos da Unidade de DST do IHMT.

Pelos resultados obtidos nas técnicas de biologia molecular utilizadas, verificou-se uma maior sensibilidade e especificidade na pesquisa de DNA de *C. trachomatis* pela técnica de PCR em Tempo Real, comparativamente com a técnica de Multiplex PCR (16 vs 12 amostras positivas).

A urina parece ser a amostra biológica a utilizar neste tipo de rastreios porque não necessita de um procedimento invasivo para a sua recolha, tendo sido bem aceite pela população estudada e aumentando assim a participação da população. Acrescenta-se também que não foram verificadas diferenças nos resultados das amostras de urina e de exsudados vaginais, podendo também esta última ser utilizada.

Verificou-se que a maioria da população apresentava anticorpos anti-*C. trachomatis* de classe IgG, indicando a presença de uma infecção passada ou presente. No entanto, apenas em dois dos 86 indivíduos com anticorpos anti-*C. trachomatis* foi identificada este microrganismo.

Esta elevada prevalência de anticorpos, assim como a prevalência de *C. trachomatis* em dois dos grupos estudados, parece sugerir a necessidade do estabelecimento de programas de rastreio, prevenção e controlo.

Assim, a serologia poderá ser um meio eficaz na avaliação da epidemiologia da infecção por *C. trachomatis* em diferentes populações, permitindo a sua correlação com comportamentos de risco e com dados sociodemográficos.

Actualmente, existe um maior o número de clínicos alertados para as consequências a longo prazo da infecção por *C. trachomatis* e que, consequentemente,

requisitam a pesquisa deste microrganismo como exame de rotina ginecológica. No entanto, a maioria dos clínicos e dos laboratórios pesquisam a infecção urogenital por *C. trachomatis* por testes não culturais utilizando amostras invasivas (exsudados endocervicais e uretrais) ou amostras não invasivas (urina ou exsudados vaginais), o que diminui a sensibilidade dos testes e consequente o número de casos positivos.

É necessária maior divulgação da infecção e dos testes de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade, como é o caso dos NAATs que apesar de mais dispendiosos têm menores resultados de falsa positividade e que permitem a utilização de amostras não invasivas como urina ou exsudados vaginais, sem que haja diminuição da sua sensibilidade e da sua especificidade.

Esta atitude (utilização de amostras não invasivas) terá consequências muito positivas na aceitação do diagnóstico clínico e do rastreio da infecção pela população.

O futuro da eficácia do rastreio da infecção urogenital por *C. trachomatis* e o seu controlo passa também pela utilização de testes rápidos que possam ser utilizados na urina, com elevada sensibilidade e especificidade e de baixo custo. A vantagem destes testes é a sua utilização em locais em que não existe equipamento laboratorial ou condições para o ter, o que acontece geralmente nos países com elevada prevalência de IST. O desenvolvimento e aplicação de testes rápidos para o diagnóstico desta infecção têm sido uma preocupação de todas as organizações envolvidas no controlo e prevenção de IST, nomeadamente OMS e UNAIDS (*The United Nations Joint Programme on HIV/AIDS*) (45, 59, 117).

Por último e como perspectiva de trabalho futuro seria importante:

- ✓ Colher um maior número de amostras, em populações com elevado risco para IST e em outros grupos populacionais como estudantes universitários, grávidas, etc;
- ✓ Comparar a presença de infecção urogenital por *C. trachomatis* e os seus genótipos em diferentes populações (estudantes vs HSH, trabalhadoras do sexo);
- ✓ Estudar a associação entre os genótipos de *C. trachomatis* e a sintomatologia dos indivíduos infectados;

- ✓ Conhecer as atitudes e comportamentos dos indivíduos com infecção urogenital por *C. trachomatis* e os vários genótipos presentes;
- ✓ Estudar os genótipos de *C. trachomatis* de indivíduos com nacionalidade portuguesa que tenham sido infectados noutros países e compara-los com genótipos de indivíduos infectados em Portugal e definir possíveis redes de transmissão;
- ✓ Estudar as inter-relações entre o vírus do papiloma humano (HPV) e os genótipos de *C. trachomatis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alexander, S., I. Martin, and C. Ison.** 2007. Confirming the *Chlamydia trachomatis* status of referred rectal specimens. *Sex Transm Infect.* **83**:327-329.
2. **ASHA (American Social Health Association).** 1999. Facts sheet on: *Sexually transmitted diseases* http://www.ashastd.org/pdfs/STDOverview_factsheet.pdf
3. **ASHA (American Social Health Association).** 2000. *Take action on HEDIS.* <http://www.cdc.gov/std/Chlamydia/hmoletter.pdf>
4. **Baken, K. B., J. A. J., Haagenen, T. Tolker-Nielsen.** 2007. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clinica Chimica Acta* **384**:1-11.
5. **Batteiger, B.** 1996. The major outer membrane protein of a single *Chlamydia trachomatis* serovar can possess more than one serovar-specific epitop. *Infection and Immunity.* **64**(2):542-47.
6. **Beagley, K., P. Timms.** 2000. *Chlamydia trachomatis* infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. *Journal of Reproductive Immunology.* **48**: 47-68.
7. **Bébéar, C., B. Barbeyrac.** 2009. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical Microbiology Infect.* **15**:4-10.
8. **Berglund, T., G. Bratt, B. Herrmann, A. Karlsson, M. Löfdahl, L. Payne.** 2005. Two cases of *lymphogranuloma venereum* (LGV) in homosexual men in Stockholm. <http://www.eurosurveillance.org/em/v11n09/1109-221.asp>.

9. **Biendo, M., J. F. Lefebvre, V. Fuentes, J. Orfila.** 1994. The prevalence of anti-*Chlamydia trachomatis* and anti-*Chlamydia pneumoniae* antibodies in Brazzaville. *Bull Soc Pathol Exot.* **87(2)**: 85-8.
10. **Black, C. M.** 1997. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical Microbiology Reviews.* **10(1)**:160–84.
11. **Borrego, M. J., J. P. Gomes, J. F. Lefebvre, F. Eb, J. Orfila, M. A. Catry.** 1997. Genotyping of portuguese *Chlamydia trachomatis* urogenital isolates. *Genitourin Med.* **73**:561-63.
12. **Bremer, V., T. Meyer, U. Marcus, O. Hamouda.** 2006. *Lymphogranuloma venereum* emerging in men who have sex with men in Germany. <http://www.eurosurveillance.org/em/v11n09/1109-223.asp>.
13. **Brito de Sá, A., J. P. Gomes, S. Viegas.** 2002. Genital infection by *Chlamydia trachomatis* in Lisbon: prevalence and risk markers. *Family Practice.* Oxford University Press. **19(4)**:362-4.
14. **Brooks, G., J. Butel, S. Morse.** 2005. Cap. 28: Clamídias. p. 289-296. *Microbiologia Médica.* The McGraw-Hill Companies.
15. **Burstein, G. R, J. M. Zenilman.** 1999. Nongonococcal urethritis – A new paradigm. *Clinical Infectious Diseases.* **28(Suppl 1)**: S66-S73.
16. **Carroll, K. C., W. E. Aldeen, M. Morrison, R. Anderson, D. Lee, S. Mottice.** 1998. Evaluation of the Abbott LCx ligase chain reaction assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine and genital swab specimens from a sexually transmitted disease clinic population. *Journal of Clinical Microbiology.* **36(6)**:1630-33.

17. **Castro, R., T. Baptista, A. Vale, H. Nunes, E. Prieto, K. Mansinho, F. Martins Pereira.** 2008. Anorectal *lymphogranuloma venereum*: the first two confirmed cases in Portugal. *Eurosurveillance*. **14(32)**.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19060>
18. **CDC.** 1996. The leading nationally notifiable infectious diseases: Morbidity, mortality weekly report. **45**:883-884.
19. **CDC.** 2004. *Lymphogranuloma venereum* among men who have sex with men – Netherlands, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **53**: 985-988.
20. **CDC.** 2002. Screening test to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR*. **51**.
21. **CDC.** 2006. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR*. **55**(RR-11).
22. **CDC.** 2007. CDC Fact sheet: LGV. <http://www.cdc.gov/std/lgv/LGV-Fact-Sheet.pdf>.
23. **CDC.** 2007. Fact sheet: *Chlamydia*.
<http://www.cdc.gov/STD/chlamydia/Chlamydia-Fact-Sheet-press.pdf>
24. **CDC.** 2007. Trends in reportable sexually transmitted diseases in the United States, 2006: National surveillance data for *Chlamydia*, *Gonorrhea* and *Syphilis*.
<http://www.cdc.gov/std/stats06/trends2006.htm>
25. **Cevenini, R., M. Donati, V. Sambri.** 2002. *Chlamydia trachomatis* – the agent. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. **16(6)**:761-73.
26. **Chernesky, M. A.** 2005. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Canadian J. Infect Dis. Med. Microbiol.* **16(1)**:39-44.

27. **Cook, R. L., S. L. Hutchison, L. Ostergaard, S. Braiyhwaite, R. N. Ness.** 2005. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med.* **142**:914-25.
28. **Den Hartog, J. E., J. A. Land, F. R. Stassen, M. E. Slobbe-van Drunen, A. G. Kessels, C. A. Bruggeman.** 2004. The role of *Chlamydia* genus-specific and species-specific IgG antibody testing in predicting tubal disease in subfertile women. *Hum Reprod.* **19**(6):1380-4.
29. **Direcção Geral de Saúde.** 2000. *Saúde reprodutiva: doenças infecciosas e gravidez.* Divisão de Saúde Materna, Infantil e dos Adolescentes. p. 29-30. http://www.arslvt.minsaude.pt/SiteCollectionDocuments/SPublica/saude_reprodutiva
30. **Donati, M., A. Di Francesco, A. D'Antuono.** 2008. *Chlamydia trachomatis* serovar distribution and other concurrent sexually transmitted infections in heterosexual men with urethritis in Italy. *Eur J. Clinical Microbiology Infect Diseases.* **28**(5):523-26.
31. **Everet, K.** 2008. Chlamydial taxonomy since 1999. <http://www.chlamydiae.com/docs/Chlamydiales/taxonomy2.asp>.
32. **Everett, K., R. Bush, A. Andersen.** 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **49**: 415-440.
33. **Figueiredo, A. A.** 1983. Linfogranuloma venéreo – estudo de casos e teste de Frei. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* **58**(2):75-8.

34. **Fredlund, H., L. Falk, M. Jurstrand, M. Unemo.** 2004. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. *APMIS*. **112**:771-84.
35. **Forrester, B., J. Pawade, P. Horner.** 2006. The potential role of serology in diagnosing chronic *lymphogranuloma venereum* (LGV): a case of LGV mimicking Crohn's disease. *Sex Transm Infect*. **82**(2):139-40.
36. **Gao, X., X-S. Chen, Y-P. Yin, et al** 2007. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* serovars among high-risk women in China performed using PCR-restriction fragment length polymorphism genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**(4):1185-89.
37. **Gaydos, C. A., D. V. Ferrero, J. Papp.** 2008. Laboratory aspects of screening men for *Chlamydia trachomatis* in the new millennium. *American Sexually Transmitted Diseases Association*. **35**(11):S45-S50.
38. **Gaydos, C. A., M. Theodore, N. Dalesio, B. Jo Wood, T. Quinn.** 2004. Comparison of three nucleic acid amplification test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**(7):3041-45.
39. **Gaydos, C. A., Am. Rompalo.** 2002. Evaluation of dry and wet transported intravaginal swabs in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in female soldiers by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**:758-61.
40. **Geiler, W. M., R. J. Suchland, W. L. H. Whittinhton, W. E. Stamm.** 2002. The relationship of serovar to clinical manifestations of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *American Sexually Transmitted Diseases Association*. **30**(2): 160-65.

41. **Gift, T., C. Gaydos, C. Kent, et al.** 2008. The program cost and cost-effectiveness of screening men for *Chlamydia* to prevent pelvic inflammatory disease in women. *Sexually Transmitted Diseases*. **35(11)**:S66-S75.
42. **Gomes, J. P., M. J. Borrego, B. Atik, I. Santo, J. Azevedo, A. Brito de Sá, P. Nogueira, D. Dean.** 2006. Correlating *Chlamydia trachomatis* infectious load with urogenital ecological success and disease pathogenesis. *Microbes and Infection*. **8**: 16-26.
43. **Hadgu, A., M. Sternberg.** 2009. Reproducibility and specificity concerns associated with nucleic acid amplification test for detecting *Chlamydia trachomatis*. *Eur J. Clin. Microbiol Infect Dis*. **28**:9-15.
44. **Herida, M., P. Sednaoui, E. Couturier, D. Neau, M. Clerc, C. Scieux, G. Kreplak, V. Goulet, F. F. Hamers, B. Barbeyrac.** 2005. Rectal *lymphogranuloma venereum*, France. *Emerg Infect Dis*. **11(3)**:505-506.
45. **Hollblad-Fadiman, K., S. M. Goldman.** 2003. Screening for *Chlamydia trachomatis*. *American Journal of Preventive Medicine*. **24(3)**:287-92.
46. **Honey, E., C. Augood, A. Templeton, I. Russell, J. Paavonen, P. A. Mardd, A. Stary, B. Stray-Pedersen.** 2002. Cost effectiveness of screening for *Chlamydia trachomatis*: a review of published studies. *Sexually Transmitted Infections*. **78**:406-12.
47. **Hu, D., E. W. Hook, S. J. Goldie.** 2004. Screening for *Chlamydia trachomatis* in women 15 to 29 years of age: a cost-effectiveness analysis. *American College of Physicians*. **141**:501-13.
48. **Ines, B., MDa. Wu, A. Robert, MPH. Schwartz.** 2008. Reiter's syndrome: the classic triad and more. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **59(1)**:113-12.

49. **Jalal, H., H. Stephen, S. Alexander, C. Carne, C. Sonnex.** 2007. Development of Real Time-PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. Journal of Clinical Microbiology. **45(8)**:2649-53.
50. **Jalal, H., H. Stephen, M. Curran, J. Burton, M. Bradley, C. Carne.** 2006. Development and validation of a Rotor-Gene Real Time-PCR assay for detection, identification and quantification of *Chlamydia trachomatis* in a single reaction. Journal of Clinical Microbiology. **44(1)**:206-13.
51. **Jaton, K., J. Bille, G. Greub.** 2006. A novel Real Time-PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. J Med Microbiol. **55**:1667-1674.
52. **Jones, B. R., L. H. Collier, C. H. Smith.** 1959. Isolation of virus from inclusion *blennorrhoea*. Lancet. **1(7079)**:902-5.
53. **Kasi, P. M., A. I. Gilani, K. Ahmad, N. Z. Janjua.** 2004. Blinding trachoma: a disease of poverty. PLoS Med. **1**:e44.
54. **Kasper, D., E. Braunwald E., A. Fauci, et al.** 1998. Cap. 181: Infecções por *Chlamydia*. p. 1129-1139. Harrison: Medicina Interna. The McGraw-Hill Companies.
55. **Kayser, F. et al.** 2005. Cap. 4: Bacteria as human pathogens. *Chlamydia*. In Medical Microbiology. p. 335-340. Thieme.
56. **Kelly, A. Cunningham, W. B. Kenneth.** 2008. Male genital tract *Chlamydial* infection: implications for pathology and infertility. Biology of Reproduction. **79(2)**:180-189.

57. **Kjaer, H. O., G. Dimcevski, et al.** 2000. Recurrence of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection evaluated by mailed samples obtained at home: 24 week's prospective follow up study. *Sex Transm Inf.* **76**:169-72.
58. **Klint, M., M. Löfdahl, C. Ek, A. Airell, T. Berglund, B. Herrmann.** 2006. Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis ompA* genotypes. *Journal of Clinical Microbiology.* **44(11)**:4066-71.
59. **Kohl, K. S., L. E. Markowitz, E. H. Koumans.** 2003. Developments in the screening for *Chlamydia trachomatis*: a review. *Obstet Gynecol Clin North Am.* **30(4)**:637-58.
60. **Kropp, R. Y., T. Wong.** 2005. Emergence of Lymphogranuloma venereum in Canada. *JAMC.* **172(13)**:1674-1876.
61. **Kucinskiene, V., I. Sutaite, S. Valiukeviciene, Z. Milasauskiene, M. Domeika.** 2006. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Medicina (Kaunas).* **42(11)**:885-94.
62. **Lan, J., J. Walboomers, R. Roosendaal, et al.** 1993. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology.* **31(5)**:1060-65.
63. **Lin, J-S. L., S. P. Donegan, et al.** 1998. Transmission of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among men with urethritis and their female sex partners. *The Journal of Infectious Diseases.* **178**: 1707-12.
64. **Lister, N. A., C. K. Fairley, et al.** 2005. *Chlamydia trachomatis* serovars causing urogenital infections in womem in Melbourne, Australia. *Journal of Clinical Microbiology.* **43(5)**:2546-47.

65. **Lysen, M., A. Osterlund, C. J. Rubin, T. Persson, B. Herrmann.** 2004. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**: 1641-1647.
66. **Low, N.** 2007. Screening programmes for chlamydial infection: when will we ever learn? *BMJ*. **334**.
67. **Low, N.** 2008. Publication of Report on *Chlamydia* Control Activities in Europe. *Eurosurveillance*. **13(7-9)**.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18924>
68. **Mabey, D., R. W. Peeling.** 2002. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect*. **78**:90-92.
69. **Mahony, J., D. Jang, S. Chong, K. Luinstra, J. Sellors, M. Tyndall, M. Chernesky.** 1997. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in first-void urine specimens by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Molecular Diagnosis*. **2(3)**:161-68.
70. **Mahony, J., K. Luinstra, M. Tyndall, J. Sellors, J. Krepel, M. Chernesky.** 1995. Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genitourinary specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **33(11)**: 3049-3053.
71. **Manavi, K.** 2006. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. **20(6)**: 941-51.
72. **Mania-Pramanik, J., S. Potdar, S. Kerkar.** 2006. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **20**:8-14.

73. **Marshall, R., M. Chernesky, D. Jang, E. W. Hook, et al.** 2007. Characteristics of the m2000 automated sample preparation and Multiplex Real Time-PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*. **45(3)**: 747-751.
74. **Mattelli, A., A. Beltrame, A. C. Carvalho, et al.** 2003. *Chlamydia trachomatis* genital infections in migrant female sex workers in Italy. *Int J STD AIDS*. **14(9)**: 591-5.
75. **Mayans, M. V., B. S. Colomo, J. M. Ossewaarde.** 2005. First case of LGV confirmed in Barcelona. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050203.asp>.
76. **Miller, K. E.** 2006. Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection. *American Family Physician*. **73(8)**:1411-16.
77. **Miller, W. C., C. A. Ford, M. Morris, M. S. Handcock, J. L. Schmitz, M. M. Hobbs, M. S. Cohen, K. M. Harris, J. R. Udry.** 2004. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA*. **291(18)**:2229-36.
78. **Moller, J. K., L. N. Pedersen, K. Persson.** 2008. Comparison of Gen-Probe Transcription-Mediated Amplification, Abbott PCR, and Roche PCR assays for detection of wild-type and mutant plasmid strains of *Chlamydia trachomatis* in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*. **46(12)**:3892-95.
79. **Morré, S. A., L. Rozendaal, I. G. M. van Valkengoed, et al.** 2000. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? *Journal of Clinical Microbiology*. **38(6)**:2292-96.

80. **Morré, S., J. Ossewaarde, J. Lan, G. van Doornum, et al.** 1998. Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G and J as confirmed by *omp1* nucleotide sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **36(2)**:345-51.
81. **Moss, T. R.** 2008. *International Handbook of Chlamydia*. 3^a ed. Euromed Communications, Ltd.
82. **Moss, T. R., S. Darougar, R. M. Woodland, M. Nathan, R. J. Dines, V. Cathrine.** 1993. Antibodies to *Chlamydia* species in patients attending a genitourinary clinic and the impact of antibodies to *C. pneumoniae* and *C. psittaci* on the sensitivity and the specificity of *C. trachomatis* serology tests. *Sex Transm Dis*. **20(2)**:61-5.
83. **Navarro, C., A. Jolly, R. Nair, Y. Chen.** 2002. Risk factors for genital *chlamydial* infection. *J. Infect Dis*. **13(3)**: 195–207.
84. **Nelson, H., M. Helfand.** 2001. Screening for *Chlamydia trachomatis*. *American Journal of Preventive Medicine*. **20(3S)**:95-107.
85. **New York City Department of Health and Mental Hygiene.** 2005. Two new city residents diagnosed with rare sexually transmitted infection; same strain found in Europe. <http://www.nyc.gov/html/doh/public/press05/pr011-05.html>.
86. **Nunes, A., M. J. Borrego, B. Nunes, C. Florindo, J. P. Gomes.** 2009. Evolutionary dynamics of *ompA*, the gene encoding the *Chlamydia trachomatis* key antigen. *J. Bacteriol*. **191(23)**: 7182-92.
87. **Nuovo, J., J. Melnikon.** 1995. Cost-effectiveness of antibiotic treatments for *Chlamydia trachomatis*. *J Am Board Fam Parct*. **8**:7-16.

88. **Oliveira, M. L., M. M. R. Amorim, P. R. E. Souza.** 2008. *Chlamydia* infection in patients with and without cervical intra-epithelial lesions tested by Real Time-PCR vs. direct immunofluorescence. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*. **12(4)**:324-28.
89. **Oliveira, M., M. M. Amorim, A. S. Souza, L. C. Albuquerque, A. A. Costa.** 2008. Infecção por *Chlamydia* em doentes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais. *Rev Assoc Med Brasileira*. **54(6)**:506-12.
90. **Olshen, E., L. A. Shrier.** 2005. Diagnostic Test for *Chlamydial* and *Gonorrheal* Infections. *Sem Pediatr Infect Dis*. **16**:192-98.
91. **Organização Mundial de Saúde.** 2005. *Orientações para o tratamento de infecções sexualmente transmitidas*. http://whqlibdoc.who.int/publications/portuguese/9248546269_por.pdf
92. **Paavonen, J., W. Eggert-Kruse.** 1999. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Human Reproduction Update*. **5(5)**: 433-447.
93. **Paavonen, J., M. Lehtinen.** 1996. *Chlamydial* pelvic inflammatory disease. *Human Reproduction Update*. **2(6)**:519–529.
94. **Passos, M. R. L., R. Q. Varella, A. E. Miranda.** 2003. *Chlamydia trachomatis*: a epidemia silenciosa. *Publicação periódica da PhOENIX*.
95. **Passos, M. R. L., R. Q. Varella, A. E. Miranda.** 2003. *Chlamydia trachomatis*: tratamento, controle de cura e manejo do parceiro sexual. *Publicação periódica da PhOENIX*.

96. **Pavlin, N., J. M. Gunn, R. Parker, C. Fairley, J. Hocking.** 2006. Implementing *Chlamydia* screening: what do women think? a systematic review of the literature. *BMC Public Health*. **6**:221.
97. **Pedersen, L. N., B. Herrmann, J. K. Moller.** 2008. Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **55**:120-130.
98. **Persson, K.** 2002. The role of serology, antibiotic susceptibility testing and serovar determination in genital chlamydial infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. **16(6)**:801-14.
99. **Piñeiro, L., M. Montes, A. Gil-Setas, X. Camino, M. J. Echeverria.** 2009. Genotipado de *Chlamydia trachomatis* e un área del norte de España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. **27(8)**:462-64.
100. **Prescott, L., J. Harley, D. Klein.** 2002. Cap21(VII): Bacteria: the *Deinococci* and *Nonproteobacteria* Gram negatives. *In* *Microbiology*. 5^a edition p. 351, 477-478. The McGraw-Hill Companies.
101. **Puolakkainen, M., E. Hiltunen-Back, J. Paavonen.** 1998. Comparison of performances of two commercially available test, a PCR Assay and a Ligase Chain Reaction Test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **36(6)**:1489-93.
102. **Reischl, U., E. Straube, M. Unemo.** 2009. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organised by instand. *Eurosurveillance*. **14(32)**.

103. **Rieg, G., R. J. Lewis, et al.** 2008. Asymptomatic sexually transmitted infections in HIV-infected men who have sex with men: prevalence, incidence, predictors, and screening strategies. *AIDS Patient Care and STDs*. **22(12)**:947-54.

104. **Roberts, T. E., S. Robison, P. M. Barton, S. Bryan, A. McCarthy, J. Macleod, M. Egger, N. Low.** 2007. Cost effectiveness of home based population screening for *Chlamydia trachomatis* in the UK: economic evaluation of *Chlamydia* screening studies (ClaSS) project. *BMJ*.

105. **Samoff, E., E. H. Koumans, et al.** 2005. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human *Papillomavirus* in a cohort of female adolescents. *American Journal of Epidemiology*. **162(7)**:668-75.

106. **Schachter, J., et al.** 2003. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol*. **41**:3784-89.

107. **Schachter, J.** 1999. *Chlamydial infections*. *The West Journal of Medicine*. **153(5)**: 523-34.

108. **Schachter, J., J. M. Chow, H. Howard, G. Bolan, J. Moncada.** 2006. Detection of *Chlamydia trachomatis* by nucleic acid amplification testing: our evaluation suggests that CDC-recommended approaches for confirmatory testing are III-Advised. *Journal of Clinical Microbiology*. **44(7)**:2512-17.

109. **Schaeffer, A., B. Henrich.** 2008. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-serovars by TaqMan PCR. *BMC Infections Diseases*. **8**:56.

110. **Scholes, D., A. Stergachis, F. E. Heidrich, et al.** 1996. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical *Chlamydia* infection. The New England Journal of Medicine. **334**:1362-66.
111. **Scottish Intercollegiate Guidelines Network.** 2009. *Management of genital Chlamydia trachomatis* infection – A national clinical guideline.
112. **Seadi, C. F., R. Oravec, M. L. Rossetti.** 2002. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. **38**(2): 125-133.
113. **Sellors, J. W., S. D. Walter, M. Howard.** 2000. A new visual indicator of chlamydial cervicitis? Sexually Transmitted Infections. **76**:46-8.
114. **Silins, I., W. Ryd, A. Strand, G. Wadell, et al.** 2005. *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. Int. J. Cancer. **116**:110–15.
115. **Singh, V., S. Salhan, B. C. Das, A. Mittal.** 2003. Predominance of *Chlamydia trachomatis* serovars associated with urogenital infections in females in New Delhi, Índia. Journal of Clinical Microbiology. **41**(3):2700-702.
116. **Stark, D., S. van Hal, R. Hillman, J. Harkness, D. Marriott.** 2007. Lymphogranuloma venereum in Australia: anorectal *Chlamydia trachomatis* serovar L2b in men who have sex with men. J Clin Microbiol. **45**(3):1029-1031.
117. **Stokes, T.** 1997. Screening for *chlamydia* in general practice: a literature review and summary of the evidence. Journal of Public Health Medicine. **19**(2):222-32.
118. **Stothard, D. R., B. E. Batteiger.** 2008. *Chlamydia trachomatis ompA* single nucleotide polymorphisms in clinical samples from sexual partnerships. Clin Infect Dis. **1**(4).

119. **Sturm-Ramirez, K., H. Brumblay, et al.** 2000. Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk women in Senegal, West Africa. *Journal of Clinical Microbiology*. **38(1)**:138-45.
120. **Sukumar, M., K. Madhuchanda.** 2000. Reactive arthritis: current perspectives. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*. **1(3)**.
121. **Thomson, N. R., M. T. G. Holden, et al.** 2008. *Chlamydia trachomatis*: Genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. *Genome Res*. **18**:161-71.
122. **Tinmouth, J., M. W. Gilmour, C. Kovacs, R. Kropp, et al.** 2008. Is there a reservoir of sub-clinical lymphogranuloma venereum and non-LGV *Chlamydia trachomatis* infection in men who have sex with men? *International Journal of STD & AIDS*. **19**:805-9.
123. **Umenai, T., S. Sakano, H. Suzuki, K. Mizuta, et al.** 1999. Study on *Chlamydia trachomatis* infection among students and pregnant women in Japan: a step toward developing a reliable method for sexual behavior study. *Thoku J Exp Med* **187(2)**:189-192.
124. **Van de Laar, M. J., K. A. Fenton, C. Ison.** 2005. Update on the European Lymphogranuloma venereum epidemic among men who have sex with men. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050602.asp>.
125. **Vandenvruaene, M., Uitbraak.** 2004. *Lymphogranuloma venereum in Antwerpen en Rotterdam*. <http://www.wvc.vlaanderen.be/epibul/47/lymphogranuloma.htm>.
126. **Vidhani, S., S. Mehta, P. Bhalla, R. Bhalla, V. K. Sharma, S. Batra.** 2005. Seroprevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among patients with pelvic inflammatory diseases and infertility. *J Commun Dis*. **37(3)**:233-8.

127. **Walsh, C., L. Anderson, K. Irwin.** 2000. The silent epidemic of *Chlamydia trachomatis*: the urgent need for detection and treatment in women. *Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine.* **9(4)**:339-43.
128. **Ward, H., S. Alexander, et al.** 2009. The prevalence of lymphogranuloma venereum infection in men who have sex with men: results of a multicentre case finding study. *Sex Transm Infect.* **85**:173-5.
129. **Ward, H., I. Martin, N. Macdonald, S. Alexander, I. Simms, K. Fenton, P. French, G. Dean, C. Ison.** 2007. Lymphogranuloma venereum in the United Kingdom. *Clin Infect Dis.* **44(1)**:26-32.
130. **Ward, M.** 2003. *Chlamydial genital tract infections.*
http://www.chlamydiae.com/restricted/docs/infections/gentrac_intro.asp
131. **Ward, M.** 2003. The *chlamydial* genome.
http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome_comparative.asp
132. **Ward, M., K. Everett.** 2002. *Chlamydiae*: Introduction: The *Chlamydiales*.
http://www.chlamydiae.com/docs/biology/biol_intro.asp
133. **Werner, F., M. D. Barth, K. Segal.** 1999. Reactive arthritis (Reiter's syndrome). *Am Fam Physician.* **60**:499-507.
134. **WHO.** 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates.
http://www.who.int/hiv/pub/sti/en/who_hiv_aids_2001.02.pdf
135. **WHO.** 2006. Trachoma control: a guide for programme managers.
<http://www.who.int/topics/trachoma/en/>

136. **Wiesenfeld, H., P. Heine, A. Rideout.** 1996. The vaginal introitus: a novel site for *Chlamydia trachomatis* testing in women. American Journal of Obstetrics & Gynecology. **174(5)**:1542-46.
137. **Wilson, J. S., E. Honey, A. Templeton, J. Paavonen, et al.** 2002. A systematic review of prevalence of *Chlamydia trachomatis* among European women. Human Reproduction Update. **8(4)**: 385-394.
138. **Winter A. J., S. Taylor, J. Workman, D. White, J. D. C. Ross, A. V. Swan, D. Pillay.** 1999. Asymptomatic urethritis and detection of HIV-1 RNA in seminal plasma. Sex Transm Inf. **75**:261-263.
139. **Wisniewski, C. A., J. A. White, C. Michel.** 2008. Optimal method of collection of first-void urine for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men. Journal of Clinical Microbiology. **46(4)**:1466-69.
140. **Woods, G., D. Walker.** 1998. Cap. 47: Infecções por clamídias, riquetsias e micoplasma. p. 1115-1120. Henry: Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. Editora Manole.